UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZÜCHTUNG VON HÜHNEREMBRYOFIBROBLASTEN- UND EMBRYONALEN RINDERLUNGEN-ZELLEN IM MIKROCARRIER-VERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ZUR VIRUSVERMEHRUNG

Karl-Heinz Bucher

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0046

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZÜCHTUNG VON HÜHNER-EMBRYOFIBROBLASTEN- UND EMBRYONALEN RINDER-LUNGEN-ZELLEN IM MIKROCARRIER-VERFAHREN UND IHRE VERWENDUNG ZUR VIRUSVERMEHRUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Karl-Heinz Bucher
aus
Riedlingen
München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent: Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c. A. Mayr
Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Gewidmet meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR ZUR HERSTELLUNG VON MASSENZELLKULTUREN	2
2.1. Massenzellkulturen auf der Basis konventioneller, verankerungsabhängiger Techniken	2
2.2. Suspensionskulturen	3
2.3. Suspensionskulturen mit Trägersystem, sogenannte Mikrocarrierkulturen	7
2.4. Ausgangsmaterial für die Herstellung von Mikrocarrier nach VAN WEZEL	8
2.5. Toxizität	9
2.6. Zellanhaftung und Verankerung	9
2.7. Zelleinsaat - Mikrocarrier-Konzentration - Zellausbeute	12
2.8. Nährmedien und pH-Regulierung	12
2.9. Physikalische Daten der Mikrocarrier	13
2.10. Kulturgefäße	14
2.11. Zellernte nach Beenden der Fermentation	14
2.12. Zellarten, die bislang auf Mikrocarrier gezüchtet wurden	17
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	18
3.1. Material und Methoden	18
3.1.1. Trägersystem (Mikrocarrier) für Suspensionskulturen	18
3.1.2. Anzuchttechnik und Kulturbedingungen	18
3.1.2.1. Kulturgefäße	18
3.1.2.2. Drehzahl	19
3.1.2.3. Temperatur	19
3.1.2.4. pH-Wert-Kontrolle	19

Seite

3.1.3. Verwendetes Zellmaterial 20
3.1.3.1. Primäre und sekundäre Zellkulturen 20
3.1.3.2. Embryonale Hühnerfibroblasten (FHE) 20
3.1.3.3. Embryonale Kälberlungenzellen (BEL) 20
3.1.3.4. Zell-Linien 21
3.1.3.5. Subkultivierung von Zellen 21
3.1.4. Gebrauchslösungen 21
3.1.4.1. Anzuchtmedium 21
3.1.4.2. Erhaltungsmedium 22
3.1.4.3. Trypsinlösungen 22
3.1.4.4. Silikonlösung 22
3.1.5. Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte 23
3.1.5.1. Quantitative und qualitative Kontrolle 23
3.1.5.2. Elektronenmikroskopie 24
3.1.6. Für die Vermehrung in den Mikrocarrier-Zellkulturen verwendete Virusstämme 25
3.1.6.1. Virusarten 25
3.1.6.2. Beimpfung der Zellkulturen auf Mikrocarrier 25
3.1.6.3. Virusernte 26
3.1.6.4. Bestimmung der Kulturinfektiosität 27
3.2. Versuche und Ergebnisse 28
3.2.1. Untersuchungen über die Optimierung der Technik beim Arbeiten mit dem Mikrocarrier-Verfahren zur Züchtung von FHE-, BEL- und Vero-Zellen 28
3.2.1.1. Untersuchungen über die Züchtung von primären FHE-Zellen mit dem Mikrocarrier-Verfahren 30

Seite

3.2.1.2. Untersuchungen über die Züchtung von sekundären FHE-Kulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren 35

3.2.1.3. Untersuchungen über die Züchtung von sekundären BEL-Kulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren 45

3.2.1.4. Untersuchungen über die Züchtung von Vero-Zell-Kulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren 51

3.2.2. Vermehrung von Viren in Mikrocarrier-Zellkulturen im Vergleich zu stationären Zellkulturen 55

3.2.2.1. Vermehrung von Hühnerpockenvirus 55

3.2.2.2. Vermehrung von Orf-Virus 59

3.2.2.3. Vermehrung von Reo-Virus 61

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 63

5. ZUSAMMENFASSUNG 69

6. LITERATURVERZEICHNIS 73

1. EINLEITUNG

Die Zellkultur ist in der experimentellen Medizin nicht mehr wegzudenken. Sie hat in vielen Bereichen den Tierversuch abgelöst. Bei der Herstellung von Impfstoffen, Antikörpern, Antigenen und sonstigen Präparaten stellt die Zellkultur als biologische "Mikroproduktionsstätte" die Methode der Wahl dar.

Die Großproduktion von Zellkulturen im industriellen Rahmen ist jedoch zu einer echten Herausforderung für die Laboratoriumstechnik geworden. Als Folge davon wurden zahlreiche Systeme zur Herstellung von Massenzellkulturen entwickelt. Die gezielte Entwicklung auf diesem Gebiet führte zur sogenannten Mikrocarrier-Technik. Dieses Verfahren befindet sich derzeit in den Anfängen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist es, die Grundlagen und technischen Gegebenheiten für die Mikrocarrier-Technik als Massenproduktion von Hühnerembryofibroblasten und embryonalen Rinderlungenzellen zu untersuchen.

Beide Zellkultursysteme sind in der Tiermedizin für die Herstellung von Impfstoffen, Paramunitätsinducern und diagnostischen Antigenen von großer Bedeutung. Gleichzeitig wurde die Vermehrung von Hühnerpockenvirus bzw. ORF-Virus in den Mikrocarrier-Zellkulturen überprüft und mit der Virusausbeute in den bisher üblichen "verankerungsabhängigen" Zellsystemen verglichen.

2. LITERATUR ZUR HERSTELLUNG VON MASSENZELLKULTUREN

Die Tatsache, daß bestimmte Zellarten (primäre Zellen und diploide Zell-Linien) nur auf einer geeigneten Unterlage zu einem dichten Einschichtzellrasen (Monolayer) wachsen, andere Zellarten (permanente Zell-Linien) sich jedoch auch ohne Anhaftung auf einer Oberfläche in Suspension vermehren, ist richtungsweisend für die Entwicklung von Systemen zur Herstellung von Zellkulturen im großen.

Wir haben es folglich mit verankerungs- und nichtverankerungsabhängigen Zellen zu tun. Dies gilt es nun in der Massenherstellung von Zellen zu berücksichtigen.

2.1. Massenzellkulturen auf der Basis konventioneller, verankerungsabhängiger Techniken

Das stete Streben nach besserer Ausnutzung von Räumen, Kulturgefäßen und Nährmedien bei der Herstellung von Zellkulturen im großen hat eine Vielzahl an Systemen und Techniken hervorgebracht. Diese Entwicklung reicht vom Gebrauch der verschiedensten Plastikkulturgefäße (BONIN, 1973 und LEVINE, 1979) über einfache Rollerkulturen (MAYR et al., 1974) und zusammengefaßte, sich drehende Glas- oder Plastikröhrensysteme (SANTERO, 1972) zu verschiedenen Perfusionsmethoden: KNAZEK und GULLINO (1972) beschreiben die Züchtung von verankerungsabhängigen Zellen in künstlichen "Kapillarien" als Matrix für die Zellen. Ferner gibt es Systeme auf der Basis gestapelter Glas- bzw. Plastikplatten, sogenannte "multisurface propagator" (SCHLEICHER und WEISS, 1968 und WEISS und SCHLEICHER, 1968). Der Vorteil dieser Techniken liegt in der besseren Ausnutzung von Raum und Medium, bergen jedoch Schwierigkeiten in ihrer Handhabung (LEVINE, 1979), speziell in der pH-Wert Regulierung und im Vorgang des Mediumwechsels.

2.2. Suspensionskulturen

Unter Suspensionskulturen versteht man Kulturen, bei denen nichtverankerungsabhängige Zellen durch ständige Bewegung am Absetzen und Festhaften gehindert werden und frei im Medium schwimmen. Sie sind hauptsächlich für die Produktion großer Zellmengen geeignet, da sie in Behältern bis zu einigen Tausend Litern Inhalt gezüchtet werden können, während die Größe der Anzuchtgefäße für Einschichtkulturen begrenzt ist.

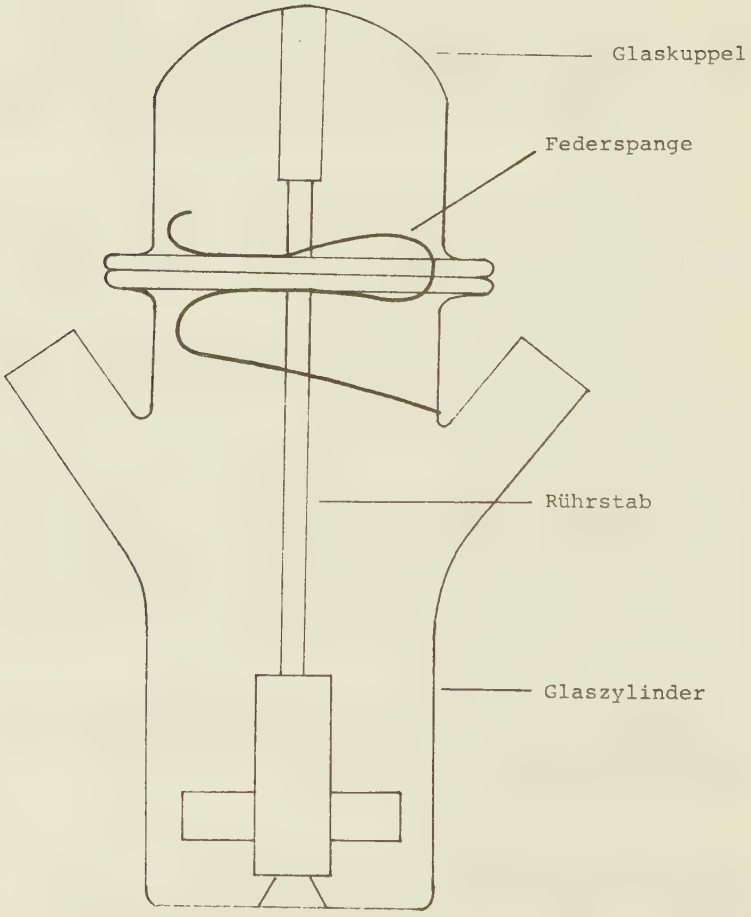
Die Zellen in Suspension werden von allen Seiten ständig mit Medium umspült, das Nährstoff- und Sauerstoffangebot ist höher; die Stoffwechselaktivität sowie die Zellteilungen steigen somit an. Demzufolge sind die Nährstoffanforderungen in Suspensionskulturen höher als in Einschichtzellkulturen. Zu den Salzlösungen werden deshalb Aminosäuren und Vitamine als Zusätze in höherer Konzentration gegeben als sie für stationäre Kulturen verwendet werden.

Als Kulturgefäße für Ansätze im kleinen werden sogenannte "Spinner"-Gefäße mit einem eingebauten Magnetrührstab für die Agitation verwendet. Solche Spinner-Gefäße sind meist aus Glas und in Größen von 25 ml bis 1000 ml kommerziell erhältlich. (siehe Abbildung 1)

Für die Großproduktion gibt es Laboratoriumsfermenter verschiedenster Größen und Volumina (VAN HEMERT, 1964, VAN WEZEL, 1973, SCHLECHT et al., 1968).

Die Temperaturregulierung erfolgt über Brutschränke, Bruträume oder Durchlauferhitzung des Mediums; bei Großverfahren über Wasserdurchlaufheizungen oder Heizspiralen, die das Kulturmedium direkt auf die gewünschte Temperatur erwärmen.

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Spinner-Gefäßes



Die pH-Kontrolle wird in großen Kulturen kontinuierlich durch pH-Meßelektroden, die sich ständig in der Zellsuspension befinden, übermittelt. Über das pH-Meter und einen Regler können Ventile für Zugabe pH-regulierender Chemikalien, Lösungen oder Gasen gesteuert werden (SCHLECHT et al., 1968, FONTANGES, DESCHAUX und BEAUDRY, 1971 und MAYR et al., 1974).

MAYR et al. beobachteten, daß die pH-Kontrolle in kleinen Gefäßen durch laufende Abgabe von kleineren Mengen KCL-Lösung aus den Meßelektroden in das Medium problematisch werden kann. Dies kann zu Wachstumshemmung durch erhöhte Salzkonzentration führen.

Die pH-Regulierung erfolgt entweder durch kontinuierliches Begasen des Mediums mit einem sterilen Gasgemisch, bestehend aus 95 % Luft und 5 % CO_2 (MACKENZIE et al., 1961, TELLING und STONE, 1964, MAYR et al., 1974 und ZAPF, 1975) oder durch Zugabe von Säure oder Base. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, daß die Isotonie des Systems nicht beeinflußt wird und die Pufferkapazität des Mediums erhalten bleibt. FONTANGES et al. (1971) verwenden NH_4OH oder NaOH alternativ zur pH-Regulierung; verzichten jedoch auf eine Begasung des Mediums. MACKENZIE et al. (1961) stellen optimale Proliferationsraten der Hela-Zellen zwischen pH-Werten von 7,38 und 7,87 fest.
TELLING und STONE (1964) fanden optimale Bedingungen für BHK-21-Zellen zwischen pH 7,2 und 7,4.

Für die Initialeinsaat beim Start von Suspensionskulturen schwanken die Angaben über die Zelldichte zwischen $5x10^4$ und $5x10^5$ Zellen/ml. (MCLIMANS et al., 1957, MOORE und ULRICH, 1965). Beim Ansetzen von Suspensionskulturen beginnt man mit kleinen Volumina und erhöht die Menge dann täglich durch Zugabe von frischem Medium, bis das gewünschte Volumen erreicht ist. Die Wachstumsrate ist

abhängig von der Ausgangszellmenge im Anfangsstadium.

In den ersten 24 - 48 Stunden nach Einsaat findet keine Vermehrung statt (lag-Phase). Bei einigen Zellarten kann sich diese Phase sogar um einige Tage verlängern. An diese lag-Phase schließt sich eine logarithmische Wachstumsphase mit Zellgenerationszeiten zwischen 15 und 50 Stunden an.

Die Kontrolle der Zelldichte erfordert eine Probeentnahme zur Feststellung der Zellzahl mit Hilfe der Liquor-Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal (MAYR et al., 1974). Als Färbung dient die Lebend-Tot-Färbung der Zellen mit Trypanblau oder die Kernfärbung nach SANFORD et al. (1951) mit anschließender Zählung der Kerne in einem Haemozytometer. Bei gut wachsenden Zellen (BHK-21-Zellen) erhält man bei einer Einsaat von $4x10^5$ Zellen/ml Medium schon nach 48 Stunden Bebrütungszeit Zellzahlen bis zu $2x10^6$ Zellen/ml (FONTANGES et al., 1971).

2.3. Suspensionskulturen mit Trägersystem, sogenannte Mikrocarrierkulturen

Bei dieser Art von Zellzüchtung handelt es sich nicht um Suspensionskulturen im herkömmlichen Sinn. Verankerungsabhängigen Zellen wird eine Anzuchtfläche in Form von "Mikroperlen" (microbeads) geboten. Nach Anhaftung der Zellen auf diesen "Mikroträgern" oder "Mikrocarrier" werden diese durch Agitation in Suspension gehalten. Die Zellen werden ähnlich wie in Suspensionskulturen allseits vom Medium umspült. Somit kann das Nährstoff- und Sauerstoffangebot von den Zellen besser ausgenützt werden.

1967 stellte VAN WEZEL fest, daß die für eine homogene Monolayerkultur notwendige Unterlage bei der Züchtung von Primärzellen und diploiden Zell-Linien durch mikroskopisch kleine Partikel in der Größenordnung der oftmals in Suspensionskulturen auftretenden Zellklumpen ersetzt werden kann. Er stellte hierbei einige wichtige Anforderungen an das Ausgangsmaterial für diese Mikrocarrier: die Zellen müssen schnell und komplett an den Partikeln anhaften können und außerdem groß genug sein, um ein paar Hundert Zellen Platz zu bieten. Ferner muß ihr spezifisches Gewicht dem der Kulturmedien entsprechen, um die Mikroträger leicht in Suspension halten zu können (VAN WEZEL, 1973). Die Oberfläche dieser Partikel soll elastisch sein, damit darauf wachsende Zellen bei einer Kollision untereinander oder mit dem Kulturgefäß nicht zerstört werden.
Bei der Suche nach geeigneten Materialien, die sich für den Zweck als Mikroträger eignen, stellte VAN WEZEL sehr rasch fest, daß Glaskugeln zu schwer sind und deshalb sedimentieren.
Er versuchte es mit Dextranpartikeln vom "Sephadex"-Typ, die den Nachteil der Glaskugeln nicht aufweisen und hatte damit Erfolg.

Erstmals züchtete er menschliche diploide Zell-Linien und primäre Kaninchennierenzellen auf diesen "DEAE-Sephadex A 50"-Mikrocarriern.

Parallel zu VAN WEZELS´Entwicklung der Mikrocarrierkulturen entwickelte VAN HEMERT (1964) geeignete Kulturgefäße für diese Art von Zellzüchtung. Es entstand die Fermentereinheit "Bilthoven-Unit", mit deren Technik heute in den Niederlanden auf der Basis sekundärer Affennierenzellen ein trivalenter Impfstoff gegen die Kinderlähmung hergestellt wird.

2.4. Ausgangsmaterial für die Herstellung von Mikrocarriern nach VAN WEZEL

Für die Herstellung der von VAN WEZEL entwickelten Mikroträger wird das in der Chromatographietechnik und als Ionenaustauscher schon lange gebräuchliche Sephadex^{R} verwendet. Es handelt sich um ein dreidimensional vernetztes Polysaccharid das durch Quervernetzung der linearen Makromoleküle von Dextran erhalten wird.
Durch Einführen von Diäthylaminoäthyläther (DEAE) als funktionelle Gruppe des Sephadex^{R} entstand ein schwach elektropositiv geladenes Polymer mit einer Ionenaustauschkapazität von 3 - 4 Milliäquvivalent pro Gramm Trockensubstanz in den Porositätsgraden A 25 und A 50 (RÖMPP, 1966).
Somit war das Ausgangsmaterial für die "DEAE-Sephadex A 50"-Mikrocarrier geschaffen (VAN WEZEL, 1967). Dieses Material ist selbst bei niederen pH-Werten im Temperaturbereich von 115 bis 120 °C nach 30 Minuten noch stabil und demzufolge autoklavierbar.

Die Mikrocarrier weisen in trockenem Zustand einen Durchmesser von 40 - 120, in gequollenem Zustand 60 - 250 Mikrometer auf. Dies bedeutet, daß nach Quellung des Materials auf der Partikeloberfläche Platz für etwa 200 - 300 Zellen ist. VAN WEZEL (1973) konnte nachweisen, daß Trägerpartikel

mit einem Durchmesser zwischen 60 - 105 Mikrometer am besten für die Anhaftung von Zellen geeignet sind.

2.5. Toxizität

In Konzentrationen höher als 1 g/Liter Nährmedium sind die zuerst benützten Mikrocarrier zelltoxisch (LEVINE et al., 1977. LEVINE et al., 1979 und HIRTENSTEIN et al., 1979). LEVINE et al. führten die toxischen Eigenschaften auf die hohe Ionenaustauschkapazität zurück. Sie umgingen nun diesen zellhemmenden Faktor, indem sie die DEAE-Sephadex A 50-Mikrocarrier verschiedenen Waschvorgängen unterzogen (LEVINE et al., 1977, LEVINE et al., 1979, VAN WEZEL, 1973).

Neben der Zelloidinbeschichtung (VAN WEZEL, 1976) führte insbesondere die Eingrenzung des Durchmessers auf eine durchschnittliche Größe von 60 - 87 Mikrometer in getrocknetem Zustand und damit zu einer Reduktion der Ionenaustauschkapazität von 4 auf 2 mA/g des ursprünglichen Produkts zu Verbesserungen hinsichtlich Toxizität, Zellwachstumsstagnation und mangelnder Anhaftung (CLARK et al., 1979 und HIRTENSTEIN et al., 1979). Mit der Weiterentwicklung der "DEAE-Sephadex A 50"-Träger zum heute im Handel erhältlichen Produkt "Cytodex^{TM}-1" (Fa. Pharmacia) konnten die toxischen Eigenschaften der Mikrocarrier nach VAN WEZEL (1967) weitgehend beseitigt werden.

2.6. Zellanhaftung und Verankerung

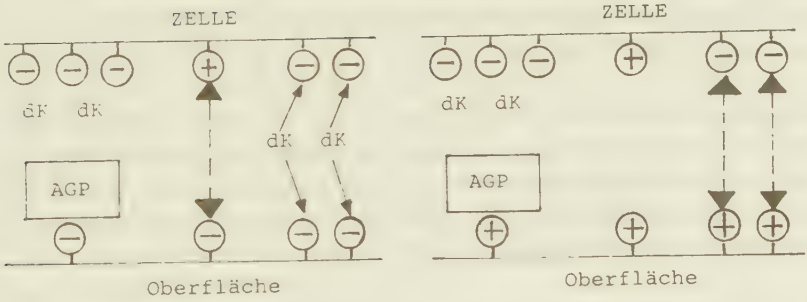
Die negative Zelloberflächenladung, die alle Wirbeltierzellen besitzen, ist im physiologischen Zustand der Zellen ungleichmäßig stark verteilt (HIRTENSTEIN et al., 1979). Demzufolge lassen sich Zellen auf Oberflächen züchten, die sowohl negative als auch positive Ladungen besitzen. Diese Tatsache trifft für herkömmliche Oberflächen und Mikrocarrier zu. Zuchtgefäße aus Glas oder Plastik weisen

vorwiegend negative Ladungen auf. Es spielen jedoch nicht nur elektrostatische Kräfte eine Rolle bei der Zell-Substrat-Anhaftung. MAROUDAS (1975) stellte fest, daß sich Zellen auch auf ungeladenen Oberflächen anhaften. Er macht dafür amphotere Proteine verantwortlich, die einerseits von den Zellen selbst synthetisiert werden oder bereits in kleinen Mengen im Serum vorkommen.

Es handelt sich dabei um ein Glykoprotein, genannt Fibronektin oder CIG (cold insoluble globulin) mit einem Molekulargewicht zwischen 200 000 und 250 000 daltons und einem isoelektrischen Punkt von 4,0 (GRINNEL et al., 1977, GRINNEL, 1980, MAROUDAS, 1975, YAMADA, 1978 und YAMADA und OLDEN, 1978).

Dieses Glykoprotein, das die Anhaftung von Zellen unterstützt, ist ein Serumfaktor und wird von verschiedenen Zellen auch selbst synthetisiert und abgegeben. Der Anhaftungsvorgang verankerungsabhängiger Zellen ist somit auf der einen Seite durch Ladungskräfte und auf der anderen Seite durch Serum- und selbstsynthetisiertes Glykoprotein bedingt (HIRTENSTEIN et al., 1979, siehe dazu Abb. 2). Aufgrund der Tatsache, daß Serumproteine eine nicht unbedeutende Rolle bei der Anhaftung und beim Wachstum der Zellen spielen, empfehlen HIRTENSTEIN et al., die Mikrocarrier vor der Zugabe der Zellsuspension mit serumhaltigem Medium (10%-Anteil) etwa 2 - 4 Stunden lang vorzubehandeln (SPIER und WHITESIDE, 1976, LEVINE et al., 1979, HIRTENSTEIN et al., 1979).

Abbildung 2: Ladungsverhältnisse bei der Anhaftung von verankerungsabhängigen Zellen auf unterschiedlich geladenen Oberflächen:
a) Glasoberfläche
b) Mikrocarrieroberfläche auf Dextranbasis



AGP = Anhaftungsglykoprotein als weiteres Bindeglied

dK = divalente Kationen

2.7. Zelleinsaat - Mikrocarrier-Konzentration - Zellausbeute

Nach HORNG und MCLIMANS (1975) wirkt sich bei gleichbleibender Zelleinsaat eine zunehmend hohe Mikrocarrier-Konzentration hemmend auf das Zellwachstum aus. Dieser hemmende Effekt liegt darin begründet, daß die Mikrocarrier auf Grund ihrer porösen Struktur zuviel Serumproteine und gewisse zellwachstumsfördernde Faktoren absorbieren. Folglich muß die Zelleinsaatmenge der Mikrocarrier-Konzentration angepaßt sein. Man findet im Schrifttum Zelleinsaatmengen von $5x10^4$/ml (Produktinformation der Fa. Pharmacia, 1979), bei primären Affennierenzellen z.B. $2x10^5$/ml (BEAUDRY et al., 1979), bei einigen Zell-Linien und bei sekundären embryonalen Hühnerfibroblasten bis zu $1x10^6$/ml Anzuchtmedium (MITCHELL und WRAY, 1979).

Während der Fermentation sollte die Zelldichte täglich bestimmt werden. Für diese Kontrolle eignet sich besonders die Kristallviolettfärbung nach SANFORD et al. (1951) mit anschließender Zählung der Zellkerne in einer Liquorzählkammer nach FUCHS-ROSENTHAL (VAN WEZEL, 1973).

Die Angaben über die Mikrocarrier-Konzentrationen reichen von 1 bis 5 g/Liter Medium (VAN WEZEL, 1967, Produktinformation der Fa. Pharmacia, 1978). Bei entsprechend hoher Mikrocarrier-Konzentration kann die Zellausbeute nach Zellart und Kulturbedingungen mehr als das 10-fache der Einsaatmenge betragen (HORNG und MCLIMANS, 1975).

2.8. Nährmedien und pH-Regulierung

Im Prinzip gelten für die Auswahl von Nährmedien die gleichen Anforderungen wie bei Suspensionskulturen.

- Mc Coy´s 5A - Medium
- Dulbeccos modifiziertes Eagleśches Medium
- Hank´s Salzlösung
- Eagleśches MEM

Als Zusätze finden hauptsächlich Kälberserum (2 - 10%), Laktalbuminhydrolysat (10%), Tryptosephosphatbouillon (2 - 10%) und Hühnerserum (0,5 - 1%) Verwendung (VAN WEZEL, 1969, MAYR et al., 1974, HORNG und MCLIMANS, 1975, LEVINE et al., 1977, GIARD et al., 1977, MEIGNIER, 1978, CLARK et al., 1979 und NICHOLSON, 1980).

Bei der pH-Wert Regulierung bedient man sich derselben Methoden wie bei Suspensionskulturen (vergleiche Kapitel 2.2.).

2.9. Physikalische Daten der Mikrocarrier

Das Gewicht von 1 cm^3 Trägersubstanz nach Quellung in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), bei einem Durchmesser von 160 - 230 µm, beträgt 1,01 - 1,18 g. Ihre geringe Dichte erlaubt es mit Drehzahlen im Bereich von 50 - 100 U/min zu arbeiten (VAN WEZEL, 1967). Die Trägerpartikel werden somit durch ständiges Rühren in Suspension gehalten. Im getrockneten Zustand haben die Partikel einen Durchmesser von ca. 60 - 90 µm, nach Quellung in PBS ca. 160 - 230 µm. Die Oberfläche eines Mikrocarriers in gequollenem Zustand beträgt etwa $1{,}2 \times 10^{-7}$ m^2.
Ein Gramm enthält etwa 5×10^6 Trägerpartikel, was einer Oberfläche von ca. 0,6 m^2 entspricht und etwa der Fläche von 24 Roux-Schalen (250 cm^2) gleichkommt (VAN WEZEL, 1973, Produktinformation der Fa. Pharmacia, 1978). Die Ionenaustauschkapazität sollte 2 Milliäquivalent/g Trockensubstanz nicht überschreiten (LEVINE et al., 1977).

2.10. Kulturgefäße

Mikrocarrierkulturen werden in kleinem Maßstab (bis max. 1000 ml) hauptsächlich in sogenannten Spinnergefäßen (siehe Abb. 1) angesetzt (SPIER und WHITSIDE, 1976, CLARK et al., 1979, NICHOLSON, 1980). Für Zellkulturen auf Mikrocarrier im großtechnischen Verfahren benützt man Fermenter. Am besten eignen sich hierfür Zylindergefäße mit nach unten gewölbten Boden oder kugelförmige Apparate mit entsprechenden Meßsonden für pH-Wert-Bestimmung, PO_2-Anzeige und weiteren Anschlüssen für Mediumwechsel und Zellernte (VAN HEMERT, 1964, VAN HEMERT, 1969 und VAN WEZEL, 1973). Ersatzweise können auch Rollerflaschen und Rollerapparaturen benützt werden. Es ist jedoch darauf zu achten, daß die Flaschen zu 2/3 gefüllt sind und eine höhere Umdrehungszahl als bei der herkömmlichen Rollertechnik gewählt wird, um die Partikel in Suspension zu halten.

Vor Gebrauch der Kulturgefäße müssen diese einschließlich Rührer und Sonden silikonisiert werden. Man verhindert dadurch das Anhaften der Zellen und Mikrocarrier an der Glaswand.

2.11. Zellernte nach Beenden der Fermentation

Die Ernte von auf Mikrocarriern gezüchteten Zellen erfolgt ebenfalls wie bei stationären Kulturen fermentativ. Man beendet den Rührvorgang und läßt die Partikel mit den Zellen absinken. Nun saugt man das überstehende Medium ab und unterzieht dann das Sediment einem Waschvorgang mit PBS. Der Überstand wird von den Mikrocarriern entfernt und durch eine 0,25 %ige Trypsinlösung ersetzt (Produktinformation der Fa. Bio-Rad, 1978 und MITCHELL und WRAY, 1979). Der Trypsinierungsvorgang geschieht bei einer Temperatur von +37°C. Sobald sich alle Zellen abgelöst haben, erfolgt die Trennung der Mikrocarrier von den Zellen mittels

eines Nylonnetzes oder Stahlsiebs aus rostfreiem Stahl mit einer Maschenweite von 60 - 100 µm (MITCHELL und WRAY, 1979), oder die aufgeschwemmten einzelnen Zellen werden ebenfalls als Überstand vom Sediment mittels einer Absaugvorrichtung oder durch Abgießen getrennt.

Tabelle 1: Übersicht über die derzeit im Handel erhältlichen Trägersysteme für die Zellzüchtung in Form von Mikrocarrier

Ausgangsmaterial zur Herstellung	poröses Silikat	Plastik	Dextran - Matrix		Polyacryl-amid
Handelsname	Spherosil^{R}	Biosilon^{R}	Cytodex^{TM}-1	Superbeads^{TM}	Bio-Carrier^{P}
Firma	nicht bekannt	Nunc	Pharmacia	Flow-Laboratories	Bio-Rad

2.12. Zellarten, die bislang auf Mikrocarrier gezüchtet wurden

Tabelle 2:

primäre Zellen	diploide Zell-Linien	permanente Zell-Linien
Affennierenzellen	HEL	SC-1, IT3
Hundenierenzellen	FS-4	NRK
Kaninchennierenzellen	humane embryonale Nierenzellen	CHO
embryonale Mäusefibroblasten	sekundäre Mäusefibroblasten	BHK-21
Mäusemacrophagen	sekundäre embryonale Hühnerfibroblasten	MDBK
Rattenpankreaszellen	Schimpansenleberzellen	CR-1
Rattenleberzellen	sekundäre Rattenfibroblasten	Vero
embryonale Hühnerfibroblasten	sekundäre Rattengliazellen	L-Zellen
Rattenhypophysenzellen	sekundäre Katzenlungenfibroblasten	HeLa
Amionzellen	sekundäre Kaninchenembryofibroblasten	MDCK
	sekundäre Affennierenzellen	KB-Zellen
	Rinderhodenzellen	SIRC

(HIRTENSTEIN et al., 1979)

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Trägersystem (Mikrocarrier) für Suspensionskulturen

Als Trägersystem dienten Mikrocarrier vom Typ Cytodex^{TM}-1 der Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden), eine Weiterentwicklung der ursprünglich von VAN WEZEL benützten DEAE-Sephadex-A 50-Beads.
Sie sind in verschiedenen Abpackungsgrößen erhältlich und werden in getrocknetem Zustand geliefert. Vor ihrem Gebrauch mußten die Mikroträger je nach Bedarfsmenge abgewogen werden und 12 Stunden lang in PBS (phosphatgepufferter Saline) ohne Mg^{++}- und Ca^{++}-Ionen bei Zimmertemperatur quellen. Dabei wurde für 1 g Trockensubstanz 50 ml PBS verwendet. Die Sterilisation erfolgte im Autoklaven. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Mikrocarrier bei Kühlschranktemperatur. 2 bis 3 Stunden vor ihrem Gebrauch wurde die gepufferte Saline nach Sedimentation der Beads als Überstand entfernt und die Mikrocarrier in Anzuchtmedium mit einem Anteil von 10 % fetalem Kälberserum erneut aufgeschwemmt.
Diese Suspension wurde anschließend im Brutschrank bei 37°C 2 bis 4 Stunden lang aufbewahrt.
Die Zusammensetzung der Nährmedien richtete sich nach der verwendeten Zellart.
Bei allen Versuchen wurden Cytodex^{TM}-1-Konzentrationen von 1 g, 2 g, 4 g und 5 g pro Liter Nährmedium benützt.

3.1.2. Anzuchttechnik und Kulturbedingungen

3.1.2.1. Kulturgefäße

Die Zellkulturen wurden in Spinnergefäßen der Fa. Bellco mit einem maximalen Faßungsvermögen von 1000 ml angesetzt; 2 seitliche Öffnungen sind für Probeentnahmen, Medium-

wechsel und andere Kontrollen während eines Kulturansatzes bestimmt.
Ein teflonbeschichteter Magnetrührstab im Gefäß verhinderte mittels eines Magnetrührers mit variabler Drehzahl die Sedimentation der Trägerpartikel. Somit war eine homogene Suspension gewährleistet (Abb. 1).
Zum Anlegen von Stationärzellkulturen dienten Roux-Schalen (250 cm^2 Anzuchtfläche) und Penicillin-Flaschen (600 cm^3 Anzuchtfläche) aus Glas.

3.1.2.2. Drehzahl

Bei allen Suspensionskulturansätzen mit Cytodex^{TM}-1 lag die Drehzahl in den ersten 24 Stunden bei 30 - 40 Umdrehungen pro Minute, wurde nach 48 Stunden auf 60 U/min eingestellt und bei einer Wachstumsdichte der Zellen auf den Beads von 80% auf 80 U/min erhöht.

3.1.2.3. Temperatur

Die Bebrütung aller Kulturansätze erfolgte bei einer Temperatur von +37°C im Brutschrank oder Brutraum.

3.1.2.4. pH-Wert-Kontrolle

Die pH-Wert-Kontrolle erfolgte mit Hilfe eines Farbindikators (1,5% Phenolrot auf 1 Liter Medium). Orientierende Stichproben sind mittels Indikatorpapier (Fa. Merck) durchgeführt worden.

3.1.3. Verwendetes Zellmaterial

3.1.3.1. Primäre und sekundäre Zellkulturen

3.1.3.2. Embryonale Hühnerfibroblasten (FHE)

Von 10-tägig bebrüteten Hühnereiern wurden die Embryonen steril entnommen, nach Entfernen von Kopf und Eingeweiden über eine Rekordspritze (Größe: 10 ml) grobsinnlich zerkleinert (durchpressen) und anschließend enzymatisch durch eine 0,25%ige Trypsinlösung in phosphatgepufferter Saline (PBS-T) aufgeschlossen. Die Trypsinierung im Erlenmeyerkolben dauerte 2 x 20 Minuten und wurde durch ständiges Rühren mit einem Magnetrührer unterstützt (MAYR und KALCHER, 1960 und MAYR et al., 1974).
Die so gewonnene Trypsin-Zell-Suspension wurde durch einen 6-fachen Gazefilter grob filtriert. Die Zellen des Filtrates sind nach zweimaliger Resuspendierung in PBS durch entsprechende Zentrifugationen gewonnen worden. Das Zellsediment wurde nach Einstellen der gewünschten Zelldichte in Anzuchtmedium aufgenommen.

3.1.3.3. Embryonale Kälberlungenzellen (BEL)

Für die Herstellung von primären Kälberlungenzellkulturen (BEL= bovine embryonic lungs) sind Lungen von 4 - 6 Monate alten Rinderfeten am geeignetsten. Die Lungen wurden steril entnommen und nach mehrmaligem Waschen in PBS und grobsinnlicher Zerkleinerung mit einer Schere eine Stunde in PBS-T vortrypsiniert. Nach Absetzen der Zellen ist der Überstand verworfen worden.
Daran anschließend erfolgte die Haupttrypsinierung. Sie erstreckte sich über 2 - 3 Stunden, wobei mehrmals die entstehende Zell-Trypsin-Suspension durch einen Gazefilter abgegossen und gesammelt wurde. Nach der Reinigung und Zentrifugation der BEL-Zellsuspension, analog zum Aufschluß der FHE-Zellen, wurde auch diese

Zelldichte im entsprechenden Anzuchtmedium aufgenommen und in die jeweiligen Kulturgefäße gegeben.

3.1.3.4. Zell-Linien

Verwendung fanden Vero-Zellen (Affennieren-Zell-Linie) und SK-Zellen (Schweinenieren-Zell-Linie). Sie wurden bis zu einem dichten Zellrasen in Roux-Schalen gezüchtet und nach dem üblichen Verfahren vermehrt.

3.1.3.5. Subkultivierung von Zellen

Für die Gewinnung von Subkulturen dienten stationäre Primärzellkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE) und embryonale Kälberlungenzellen (BEL), bzw. die Ausgangspassage entsprechender Zell-Linien. Die Ablösung der Zellen von der Kulturgefäßoberfläche erfolgte mit einer Trypsin-Versen-Lösung. Bei diesem Vorgang wurde das Nährmedium abgegossen, der Zellrasen mit Trypsin-Versen-Lösung kurz gewaschen und mit einer geringen, auf dem Monolayer verbleibenden Menge benetzt. Nach kurzem Bebrüten bei +37°C löste sich der Zellrasen vollständig von der Glasoberfläche. Die in der Lösung befindlichen Zellen wurden abzentrifugiert und anschließend nach Einstellen der gewünschten Zelldichte in Anzuchtmedium aufgenommen und entsprechend kultiviert.

3.1.4. Gebrauchslösungen

3.1.4.1. Anzuchtmedium

Als Anzuchtmedium für primäre und sekundäre FHE diente Earle MEM mit 5% fetalem Kälberserum (FKS), 0,5 - 2% Hühnerserum (HS), 10% Laktalbuminhydrolysat (LA), 1% $NaHCO_3$, 100 I.E. Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml Medium. In einigen Kulturansätzen mit FHE wurde als weiterer Zusatz zum Anzuchtmedium Tryptosephosphatbouillon in den Kon-

zentrationen 10 und 20% verwendet.
Das Anzuchtmedium für primäre und sekundäre BEL setzte sich aus Earle MEM mit 5% FKS, 1% $NaHCO_3$, 100 I.E. Penicillin und 100 µg Streptomycin pro ml Medium zusammen.
Zell-Linien wurden in Earle MEM mit 5% FKS, 1% $NaHCO_3$ und der üblichen Antibiotikazugabe aufgenommen und angesetzt.

3.1.4.2. Erhaltungsmedien

Das Erhaltungsmedium für die primären und sekundären FHE bestand aus steriler Rinderammionflüssigkeit (RAF) mit 1,5% Phenolrot und dem üblichen Antibiotikazusatz.
Das Erhaltungsmedium für BEL setzte sich zusammen aus Earle MEM mit 2% FKS und dem gebräuchlichen Antibiotikaanteil. Das gleiche Erhaltungsmedium wurde für die permanenten Zell-Linien benützt.

3.1.4.3. Trypsinlösungen

Die enzymatische Aufschließung der Hühnerembryonen und der embryonalen Kälberlungen erfolgte mit einer 0,25%igen Trypsinlösung in PBS (PBS-T).
Zur Subkultivierung der Primärkulturen und permanenten Zell-Linien diente ein Gemisch von Versen (0,025%) und Trypsin (0,05%) in Aqua dest.
Die Trypsinlösungen wurden stets vor ihrem Gebrauch frisch hergestellt und zur Verwendung auf eine Temperatur von 37°C gebracht.

3.1.4.4. Silikonlösung

Das Anhaften von Zellen und Mikrocarrier an der Glaswand der Kulturgefäße wurde durch Beschichtung der Glaswand mit Silikon verhindert. Eine 5%ige Silikonlösung hergestellt aus Silikonöl mittlerer Viskosität (AK 350, Fa. Bayer) in Essigsäureäthylester (Fa. Merck), ein organisches Lösungsmittel, war für die Silikonisierung ausreichend.

3.1.5. Bestimmung von Zellzahl und Zelldichte

3.1.5.1. Quantitative und qualitative Kontrolle

Bestimmung der Zelldichte für die Einsaat. Die Bestimmung der Zelldichte für die Kulturansätze erfolgte durch Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau (1 g Trypanblau-Trockensubstanz werden in 100 ml PBS gelöst und filtriert) und anschließender Zählung der Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

Ermittlung der Zelldichte auf Mikrocarrier. Das Zellwachstum wurde lichtmikroskopisch im 24-stündlichen Intervall nach Färbung mit einer Hämatoxylinlösung, bestehend aus 0,1 g Hämatoxylin, 0,02 g Natriumjodit, 1 g Kaliumaluminiumsulfat, 5 g Chloralhydrat und 0,1 g Zitronensäure gelöst in 100 ml destilliertem Wasser, sowie einer kurzen Gegenfärbung mit einer 0,5%igen wässrigen Eosinlösung kontrolliert.
Ebenso wurde die Zelldichte während des Kulturvorganges im Abstand von 24 Stunden nach der Kernzählungsmethode ermittelt (SANDFORD et al., 1951). Hierzu diente eine 0,1%ige Kristallviolettlösung in 0,1-molarer Zitronensäure. Dabei wurden 5 ml gut suspendiertes Kultur-Medium aus dem Gefäß entnommen und zur Sedimentation der Trägerpartikel in ein 10 ml Kappenröhrchen gegeben. Der Überstand wurde dann abpipettiert und durch 5 ml Kristallviolettlösung ersetzt, gut durchsuspendiert und 1 Stunde im Brutschrank bei +37°C belassen. Anschließend erfolgte die Zählung der aus dem Zellverband gelösten Zellkerne mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

3.1.5.2. Elektronenmikroskopie*

48 Stunden nach Anzucht wurden sekundäre FHE- und BEL-Kulturen hinsichtlich ihres Wachstumverhaltens und ihrer Anhaftung auf den Mikrocarriern elektronenmikroskopisch untersucht.

Rasterelektronenmikroskopische-Kontrolle (REM-Kontrolle) Für die REM-Kontrolle wurden die entsprechenden Proben in einer 1%igen Glutaraldehydlösung (0,15 M Na-Cacodylat-Puffer, pH 7,3) 1 Stunde fixiert und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Zur REM-Untersuchung wurden die Proben in absoluten Alkohol auf den Objektteller übertragen und luftgetrocknet; mit Gold beschichtet (20 nm Schichtdicke) und mit einem "Autoscan" (Forschungslabor der Fa. Siemens, München-Neuperlach, Otto-Hahn-Ring, Abt. Dr. FUCHS, Aufnahmen von Prof. Dr. LIEBICH, 1981) untersucht.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung (TEM-Untersuchung) Für die TEM-Untersuchungen wurden Proben von FHE verschiedenen Alters (48 Stunden, 72 Stunden, 120 Stunden - 24 Stunden p. inf., bzw. 144 Stunden - 48 Stunden p. inf.) ausgewählt.
Die Fixierung des Zellmaterials auf den Mikroträgern erfolgte in 5 ml 1%iger Glutaraldehydlösung (0,15 M Na-Cacodylatpuffer, pH 7,3) 1 Stunde bei +4°C. Nach 12 Stunden waschen mit Na-Cacodylat mit Saccharosezusatz wurden die Proben in 1% OsO_4 (Fa. Merck) kontrastiert (3 Stunden) und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung der Mikrocarrier erfolgte in Araldit.

---

*Die Präparationen des Untersuchungsmaterials zur elektronenmikroskopischen Strukturanalyse wurde am Lehrstuhl für Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München von Prof. Dr. H.G. Liebich durchgeführt.

Geeignete Ultradünnschnitte wurden mit Hilfe eines LKB-Ultrotoms hergestellt; die Schnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und in einem Elmiskop 101 (Fa. Siemens) untersucht (LIEBICH, 1981).

3.1.6. Für die Vermehrung in den Mikrocarrier-Zellkulturen verwendete Virusstämme

3.1.6.1. Virusarten

Für die Vermehrungsversuche auf Mikrocarrier-Zellkulturen wurden folgende Virusarten verwendet:

Geflügelpocken-Virus (Avipoxvirus gallinae) Stamm HP-1, Kulturvirus der 440. Passage in Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE).
Die Stammsuspension enthielt $10^{7,5}$ KID_{50}/ml.

Orf-Virus, Stamm D-1701, Kulturvirus der 3. Passage in Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen (BEL). Abstammung der Stammsuspension: 135. embryonale Schafnierenpassage, plaquegereinigtes Material. Der Virustiter betrug $10^{7,5}$ KID_{50}/ml.

Reo-Virus, Typ 1, Stamm Lang, Kulturvirus der 4. Passage in Vero-Zellkulturen mit einem Titer von $10^{8,25}$ KID/ml.

3.1.6.2. Beimpfung der Zellkulturen auf Mikrocarrier

Vermehrung von HP-1-Virus auf sekundären FHE-Zellen. Nach Sedimentation der mit Zellen dicht bewachsenen Mikrocarrier wurde der Überstand entfernt und durch virushaltiges, gut suspendiertes Erhaltungsmedium ersetzt. 1 ml Erhaltungsmedium enthielt $6x10^{5,5}$ KID_{50} Virus. Nach einer kurzen Inkubationszeit (10 min) wurde das Kulturgefäß wieder auf den Magnetrührer gestellt, um die Trägerpartikel wieder in Suspension zu bringen.

Vermehrung von Orf-Virus D-1701 auf sekundären BEL-Zellen. Auch bei diesen Zellen wurde, analog zu dem Beimpfungsmodus der FHE-Zellen, bei geschlossenem Zellrasen das Anzuchtsmedium durch virushaltiges Erhaltungsmedium ersetzt und wieder in Suspension gebracht. 1 ml Erhaltungsmedium enthielt $1x10^{6,5}$ KID_{50} Virus.

Vermehrung von Reo-Virus (Stamm Lang) auf Vero-Zellen. Die Infizierung verlief wie in den HP-1- und Orf-Versuchen. 1 ml Erhaltungsmedium enthielt $8,75x10^{5,25}$ KID_{50} Virus.

3.1.6.3. Virusernte

HP-1-Virusernte aus den sekundären FHE-Zellen. Die Virusernte erfolgte in der Regel am 4. Tag p. inf.: zu diesem Zeitpunkt war der cytopathische Effekt (cpE) bei etwa 90% des Zellrasens deutlich ausgeprägt. Im Anschluß an ein Gefriertauen (-20°C) wurde die virushaltige-Suspension 15 Minuten bei 250 - 300 Watt pulsierend mit Ultraschall behandelt (Branson Sonifier B30). Nach Sedimentation der Mikrocarrier wurde die Suspension aus Zellfragmenten und Virusmaterial abgehebert, der Detritus abzentrifugiert (2100 UpM, 4°C) und der Überstand bis zur Bestimmung der Kulturinfektiosität bei -70°C gelagert.

Orf-Virusernte aus den sekundären BEL-Zellen. Etwa 2 Tage p. inf. war der cpE bei etwa 90% der Zellen voll ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurde geerntet. Nach einem Gefriertauen (-20°C) wurde die Suspension 3 min bei 300 Watt kontinuierlich mit Ultraschall behandelt. Danach erfolgte in gleicher Weise wie bei den Hühnerpocken die Trennung des Virus von Zellmaterial und Trägersystem und dessen Lagerung bei -70°C.

Reo-Virusernte aus Vero-Zellen. Das Virus wurde in der Regel am 2. Tag p. inf. (cpE bei 80 - 90% des Zellrasens) geerntet und bei -70°C bis zur Wiederverwendung aufbewahrt.

3.1.6.4. Bestimmung der Kulturinfektiosität

a) Qualitativ wurde die Virusvermehrung anhand des auftretenden cpE im Abstand von 24 Stunden lichtmikroskopisch verfolgt. Es diente hierbei die in Kapitel 3.1.5.1. beschriebene Färbemethode.

b) Die quantitative Bestimmung des Virusgehaltes der Ernten erfolgte durch Titrierung (10er-Potenzen) in den entsprechenden Zellkulturen. (Berechnung des Virustiters nach der Methode von KÄRBER (1931) und SPEARMAN (1931) in 50% kulturinfektiösen Dosen (KID_{50})).

Folgende Kultursysteme wurden für die Virustitrierungen verwendet:

Hühnerpocken-Virus: Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE). Der Virustiter wurde mittels cpE bestimmt. Die Beobachtungszeit betrug 9 Tage. In Zweifelsfällen wurden in den Endverdünnungen Subkulturen durchgeführt.

Orf-Virus: Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen (BEL). Der Virusnachweis in den BEL-Kulturen erfolgte anhand des cpE. Die Beobachtungszeit betrug 8 Tage. In Zweifelsfällen wurde wie oben verfahren.

Reo-Virus: Für die Titrierungen wurden VERO-Zellen benützt. Der Virusnachweis wurde über den cpE geführt. In Zweifelsfällen wurde wie oben verfahren.

3.2. Versuche und Ergebnisse

3.2.1. Untersuchungen über die Optimierung der Technik beim Arbeiten mit dem Mikrocarrier-Verfahren zur Züchtung von FHE-, BEL- und Vero-Zellen

Das Arbeiten mit Suspensionskulturen über Trägersysteme, sogenannte Mikrocarrier-Kulturen, befindet sich noch durchaus in den Anfängen. Die bisher beschriebenen Methoden für die Züchtung von menschlichen diploiden Zell-Linien, sekundären Affennierenzellen und primären Kaninchenzellen weisen bereits daraufhin, daß praktisch für jedes Zellsystem eigene technische Gegebenheiten entwickelt werden müssen. Relativ problemlos ist, nach den bisherigen Erfahrungen, die Züchtung permanenter Zell-Linien. Bei primären bzw. sekundären Zellkulturen muß dagegen der Individualität der einzelnen Zellart Rechnung getragen werden.

In der Tiermedizin gewinnen für die Herstellung von Impfstoffen, Paramunitätsinducern und Anreicherung von Antigenen die folgenden Zellkultur-Systeme zunehmend an Bedeutung: die Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (FHE-Kulturen) und die Zellkulturen aus embryonalen Rinderlungenzellen (BEL-Kulturen). Beide Zellkultur-Systeme lassen sich relativ einfach auf einer geeigneten "Unterlage" etablieren. Durch die Wachstumsintensität der Zellen kommt es sehr schnell zu einem geschlossenen Zellrasen, der sich aber relativ rasch von der Unterlage ablöst. Die Vermehrung von Virusarten mit einer relativ langen "Vermehrungsphase", ihre Titrierung und die Beobachtung eines fortschreitenden cytopathischen Effekt (cpE) sind dadurch erschwert.

Über die Kultivierung von FHE- und BEL-Zellen ist in einem Fall nur sehr wenig, im anderen Fall bisher noch nichts bekannt. Die Untersuchungen befassten sich deshalb mit den technischen Voraussetzungen für die Züchtung

dieser Zellen im Mikrocarrier-System und sollten dabei gleichzeitig die Parameter aufzeigen, welche generell für die Mikrocarrier-Technik essentiell sind. Zum Vergleich wurden Versuche mit permanenten Zell-Linien herangezogen (Vero-Zellen und SK-Zellen).

In Vorversuchen ließen sich folgende Kriterien für eine optimale Zellzüchtung im Mikrocarrier-Verfahren eruieren:

1. Art der Kulturgefäße,
2. Drehzahlbereich des Magnetrührers,
3. physikalische Beschaffenheit der Carrier, und deren Eignung zur Aufnahme von Zellen,
4. Zellansatz und Probleme der Verklumpung der Zellen,
5. Zellanhaftung und Verankerung an den Carriern,
6. Anzuchtmedien und deren Zusätze,
7. geeigneter Zeitpunkt für Mediumwechsel,
8. Temperaturregulation,
9. pH-Wert-Kontrolle und Pufferung,
10. Eignung der zu züchtenden Zellen für dieses System,
11. Persistenz der sich an den Carrier vermehrenden Zellen und deren Wachstumsverhalten,
12. qualitative und quantitative Kontrolle des Zellwachstums,
13. Probleme mit gehäuftem Auftreten von bakteriellen und mykologischen Kontaminationen und deren Einfluß auf Zellanhaftung und Wachstum.

3.2.1.1. Untersuchungen über die Züchtung von primären FHE-Zellen mit dem Mikrocarrier-Verfahren

Die Kultivierung von primären FHE-Zellen weist bei der herkömmlichen stationären Methode eine Reihe von Schwierigkeiten, z.B. hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens, der Persistenz auf der Kulturgefäßoberfläche und bakterieller und mykologischer Kontamination auf.

Bei der Anwendung der Mikrocarrier-Technik auf die Züchtung dieser Zellart galt es nun, dieses System mit den Gegebenheiten der stationären Methode zu vergleichen und Techniken zu erarbeiten, die eine Züchtung auf den ihnen angebotenen Mikroträgern ermöglichen und gleichzeitig eine lange Persistenz auf den Carriern gewährleisten.

Zunächst erfolgte die Gewinnung der primären FHE-Zellen gemäß der Beschreibung in Kapitel 3.1.3.2.
Währenddessen wurden die sterilen Mikrocarrier 4 Stunden lang in Earle MEM mit 10% fetalem Kälberserumanteil bei +37°C bebrütet. Nach Einstellen der gewünschten Zelldichte wurde das gewonnene Zellsediment in Anzuchtmedium, bestehend aus Earle MEM mit 5% FKS, 10% LA, 10% Trypthose-phosphatbouillon, 1% $NAHCO_3$ und der üblichen Antibiotikazugabe aufgenommen. Danach wurde zu der Zellsuspension die vorbehandelten Mikrocarrier gegeben, kräftig mit einer Pipette durchsuspendiert und in ein silikonbeschichtetes Spinner-Gefäß gegeben. (Siehe Abb. 1)

Die Anfangsschwierigkeiten bei diesem System lagen nun hauptsächlich darin, daß die FHE-Zellen während der Anhaftungsphase auf den Trägerpartikeln sehr rasch untereinander verklumpten und somit für eine Anhaftung auf den Mikrocarriern nicht mehr zur Verfügung standen. Diese Zellklumpenbildung, die bis zu ca. 80% der Zellen erfaßte, ließ sich lichtmikroskopisch gut beobachten. Eine Zugabe von 0,5% Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Merck) konnte die Zellverklumpung in

einer größeren Zahl der Kulturansätze bis auf ca. 50% der Zellen reduzieren, führte gleichzeitig zu einer homogenen Verteilung der Zellen auf den Mikrocarriern und steigerte die Persistenz der Zellen, die bisher max. 3 - 4 Tage betrug, auf 6 - 8 Tage. Diese Steigerung der Verweildauer des Zellrasens auf den Trägerpartikeln ist entscheidend für eine Virusvermehrung, z.B. von Hühnerpocken-Virus (HP-1).

Ein kurzes Durchmischen der Suspension während der 4 Stunden dauernden Inkubationszeit wurde im halbstündlichen Abstand durchgeführt und wirkte sich positiv auf die homogene Verteilung der Zellen auf den Trägerpartikeln aus. Ferner galt es auch die Drehzahlsteigerung am Magnetrührer von einer Ausgangsdrehzahl von 40 UpM auf maximal 80 UpM während eines Kulturansatzes für jeden Versuch individuell anzuwenden, um nicht ein frühzeitiges Ablösen der Zellen von den Mikrocarriern durch zu hochtouriges Rühren zu provozieren.

Eine weitere Schwierigkeit, die sich hemmend auf die Zellanhaftung und Vermehrung auswirkte, war das gehäufte auftreten von bakteriellen und mykologischen Kontaminationen, begünstigt durch die im 24 Stunden-Intervall durchgeführten Probeentnahmen zur qualitativen und quantitativen Beurteilung (siehe Kapitel 3.1.5.1.). Dabei mußte jedesmal das Spinner-Gefäß geöffnet werden.

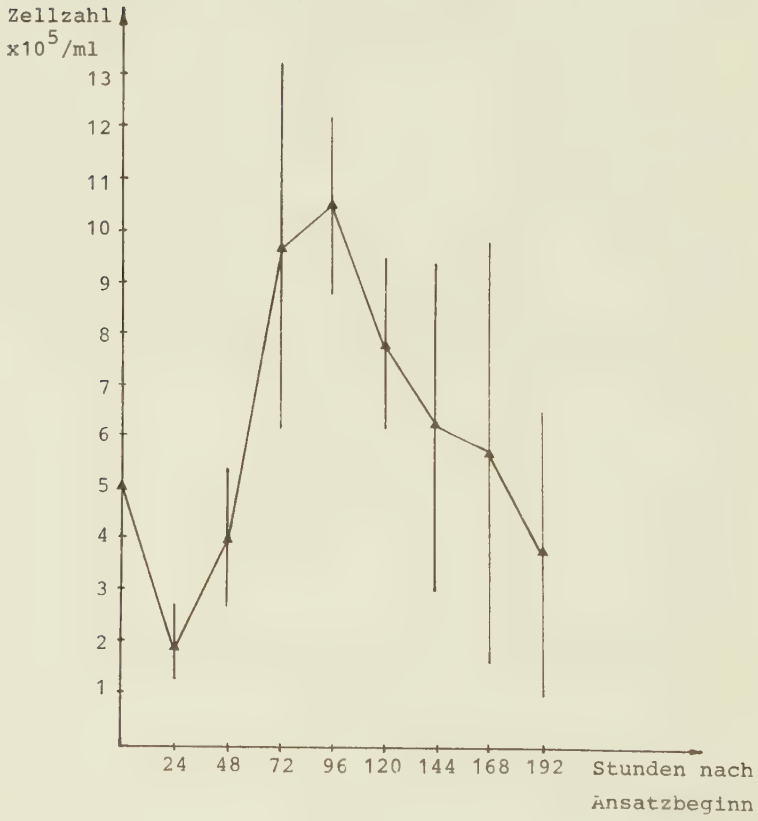
Das Präparat DMSO erwies sich bei längerem Verbleib im Anzuchtmedium als wachstumshemmend, dies machte somit den ersten Mediumwechsel 24 Stunden nach Kulturansatzbeginn erforderlich. Das dazu verwendete Medium bestand aus Rinderamnionflüssigkeit (RAF) mit 5% fetalem Kälberserum (FKS), 2% Hühnerserum (HS), 1,5% Phenolrot und der üblichen Antibiotikazugabe. RAF mit den oben erwähnten Zusätzen erwies sich als äußerst gut geeignet für diese Zellart. Es wird ohne Serumanteil bei der stationären Züchtung von FHE-Zellen als Erhaltungsmedium verwendet.

Unter Berücksichtigung der in einer Reihe von Vorversuchen gewonnenen Erkenntnisse erzielten wir bei primären FHE-Zellen durchschnittlich bis zu $9{,}0 \times 10^5$ Zellen/ml Medium, maximal sogar bis zu $1{,}3 \times 10^6$ Zellen/ml Medium am 3. Tag nach Kulturbeginn bei einer Einsaatdichte von 5×10^5 Zellen/ml Medium und einer Mikrocarrier-Konzentration von 2 g Trockensubstanz/l Medium. Eine geringgradige Ablösung der Zellen von den Mikroträgern konnte in wenigen Versuchen ab dem 5. Tag nach Kulturbeginn schon lichtmikroskopisch und anhand der Kernzählungsmethode nach SANFORD et al. (1951) beobachtet werden. Nach dem 8. Tag erfolgte eine massive Ablösung von den Trägerpartikeln. Dabei wucherten die FHE-Zellen zunächst zu einem Mehrschichtzellrasen ("Polylayer") und lösten sich dann im weiteren Verlauf als kleine Zellklumpen von der Carrieroberfläche ab.
Sämtliche Versuche wurden im Brutraum bei +37°C durchgeführt. In der Abbildung 3 und Tabelle 3 ist das Wachstumsverhalten der primären FHE-Zellen auf Mikrocarrier zusammengestellt.

Tabelle 3: Übersicht über das Wachstumsverhalten bei der Züchtung von primären FHE-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Zeit in Stunden	Durchschnittswert $x10^5$/ml	minimaler Wert $x10^5$/ml	maximaler Wert $x10^5$/ml
0	5,0	5,0	5,0
24	1,9	1,3	2,7
48	4,0	2,6	5,3
72	9,5	6,0	13,0
96	10,3	8,6	12,0
120	7,6	6,0	9,3
144	6,1	3,0	9,2
168	5,6	1,6	9,6
192	3,7	1,0	6,4

Abbildung 3: Vermehrungskurve von primären FHE-Zellen auf Cytodex^{TM}-1-Mikrocarrier bis zur Ablösung der Zellen von den Trägerpartikeln



3.2.1.2. Untersuchungen über die Züchtung von sekundären FHE-Kulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren

Aus Erfahrungen weiß man, daß sich durch Anlegen von Subkulturen aus primären FHE-Zellen homogenere Zellrasen gewinnen lassen. Die Gründe hierfür sind vielfältig. Einer der Gründe liegt wahrscheinlich darin, daß die Zellen eine einheitliche Morphologie besitzen, d.h. bereits selektiert sind. Zum anderen sind sie sicher auch schon stimuliert.

Die in Penicillinflaschen dichtgewachsenen primären FHE-Zellen wurden enzymatisch mittels einer Trypsin-Versen-Lösung (siehe Kapitel 3.1.4.3.) von der Glasoberfläche der Kulturgefäße abgelöst und durch Zentrifugation von der oben erwähnten Lösung getrennt. Das erhaltene Zellsediment wurde auf die zu Anfang gewählte Einsaatdichte von $2{,}5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt und in Anzuchtmedium, das in seiner Zusammensetzung dem Anzuchtmedium der primären FHE-Zellen entsprach, aufgenommen. Sehr rasch erwies sich diese Einsaatdichte als zu niedrig für die Mikrocarrier-Kulturansätze und wurde daher, analog den Primäransätzen von FHE, auf 5×10^5 Zellen/ml erhöht. Auch bei den sekundären FHE-Zellen mußte dem Anzuchtmedium 0,5% DMSO zugegeben werden, weil bei diesen Zellen ebenfalls eine Verklumpung während der Anhaftungsphase auf den Mikrocarriern beobachtet wurde. Der DMSO-Anteil bzw. dessen wachstumshemmender Einfluß wurde durch einen Mediumwechsel mit RAF in gleicher Zusammensetzung wie bei den primären Mikrocarrier-Kulturansätzen der FHE 24 Stunden nach Ansatzbeginn eliminiert.
Bei allen Kulturansätzen mit sekundären FHE-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren wurden mit 10% FKS-haltigem Medium 4 Stunden vorbehandelte Mikroträger in einer Konzentration von 2 g Trockensubstanz/l Medium verwendet. Ferner wurden sämtliche Versuche mit diesen Zellen im Brutraum bei +37°C durchgeführt. Die Inkubationszeit vor jedem Zellansatz war auf 4 Stunden anberaumt. Auch hier erfolgte ein kurzes Durchmischen der Suspension im Halbstundenintervall.

Je nach Wachstumsintensität und pH-Wert-Verlauf während der Dauer der Zellkulturansätze (pH-Wert nicht unter 7,0) wurde das Nährmedium nochmals erneuert. Dies war jedoch von Versuch zu Versuch individuell verschieden. Die Drehzahlsteigerung von 40 auf maximal 80 UpM wurde für jeden Zellansatz gesondert angewandt.

Beim Vergleich der Zellausbeute von primären und sekundären FHE-Kulturen im Mikrocarrier-Verfahren fällt auf, daß zunächst die Zellanzuchtmenge stark reduziert wird bevor es zur Anhaftung und zur erneuten Zellvermehrung auf den Carriern kommt. Dieses Phänomen ist nicht neu, sondern auch bei allen bisher durchgeführten Mikrocarrier-Verfahren bekannt. In der Regel rechnet man damit, daß etwa 20 - 40% der eingesäten Zellen nicht zur Anhaftung und Vermehrung an den Carriern kommen. Als Gründe hierfür werden vor allen Dingen eine physiologische Absterberate der Zellen und das Bestreben, untereinander zu verklumpen, was eine Adsorption an die Trägerpartikel verhindert, diskutiert. Die natürliche Absterberate ließ sich durch Manipulation bezüglich Zusammensetzung des Anzuchtmediums und sonstigen technischen Kniffs nicht verringern.
Die Zellverklumpungen konnten dagegen durch einen Zusatz von DMSO wesentlich reduziert werden. Hierdurch erhielten wir bei der Züchtung von primären FHE-Zellen im Mikrocarrier-System eine Zellanzuchtrate von maximal 54% im Vergleich zur Zelleinsaat und bei den sekundären FHE-Zellen hafteten bis zu maximal 52% der Zellen an den Mikroträgern an.

Jedoch das weitere Wachstumsverhalten der Sekundärzellen kam dem der Primärzellen in keinster Weise gleich. Dies ist aus den Tabellen 3 und 4 und den Abbildungen 3 und 9 ersichtlich.

Möglicherweise läßt sich dieses "reduzierte" Wachstumsverhalten der Sekundärzellen durch eine höhere Zelleinsaat bei

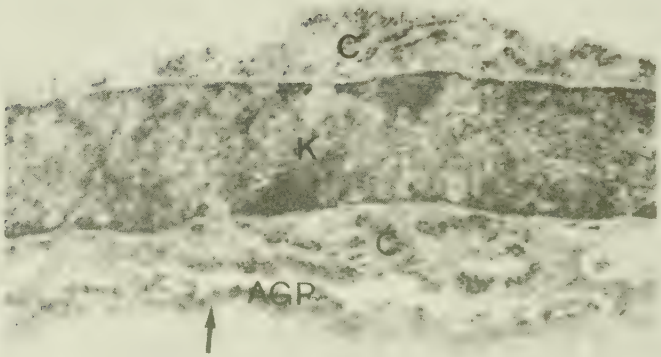
ihrer Züchtung im Mikrocarrier-Verfahren verbessern. Trotzdem muß man jedoch dabei folgende Parameter berücksichtigen: aus einer primären FHE-Zellkultur kann man in der Regel 2 mal soviel sekundäre Zellkulturen anlegen, zum anderen sind bezüglich Virusvermehrung und Virusausbeute sekundäre Zellkulturen einheitlicher und auch in bezug auf latente Virusinfektionen unbedenklicher. Im fortgeschrittenen Kulturverlauf zeigten auch die Sekundärzellen das Bestreben auf dem einen oder anderen Mikrocarrier einen Mehrschichtzellrasen auszubilden. Hierzu erfolgten neben den täglichen qualitativen und quantitativen Kontrollen noch zusätzliche elektronenmikroskopische Untersuchungen. Dabei wurden 48 Stunden alte sekundäre FHE-Zellen auf den Mikrocarrier rasterelektronenmikroskopisch (REM) untersucht und fotografiert (Abb. 4 und 5). In Ultradünnschnitten von sekundären FHE-Zellen wurde transelektronenoptisch die Ausbildung von Mono-, Di- und Trilayern auf den Trägerpartikeln nachgewiesen und ebenfalls fotografiert (Abb. 6, 7 und 8).

Bei den durchgeführten sekundären FHE-Zellansätzen auf Mikrocarrier erhielten wir folgende Durchschnittswerte (siehe Tabelle 4). Eine graphische Darstellung des Zellwachstums ist in der Abbildung 9 wiedergegeben.

Abbildung 4: 48 Stunden alte sekundäre FHE-Zellen auf Cytodex^{TM}-1, 500-fach vergrößert (REM-Aufnahme)

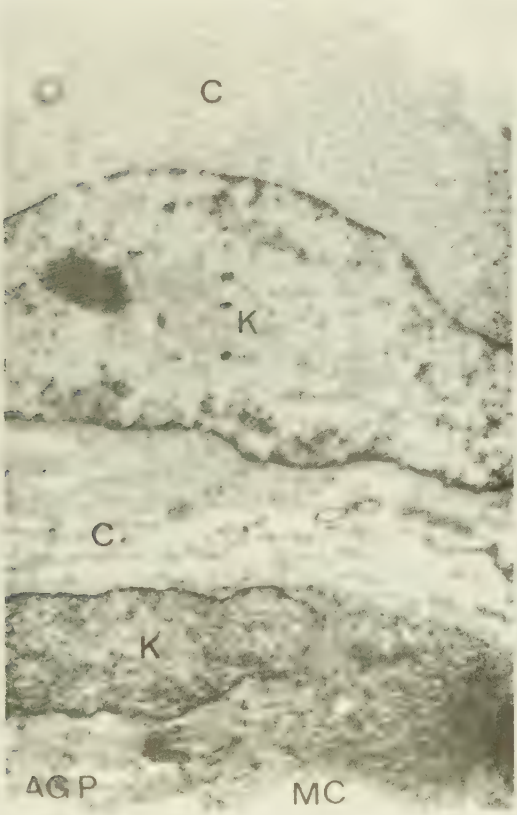
Abbildung 5: 48 Stunden alte sekundäre FHE-Zellen auf Cytodex^{TM}-1, 200-fach vergrößert (REM-Aufnahme)

Abbildung 6: Ultradünnschnitt durch eine 120 Stunden alte sekundäre FHE-Zelle, auf einem Mikrocarrier als "Monolayer" gewachsen.



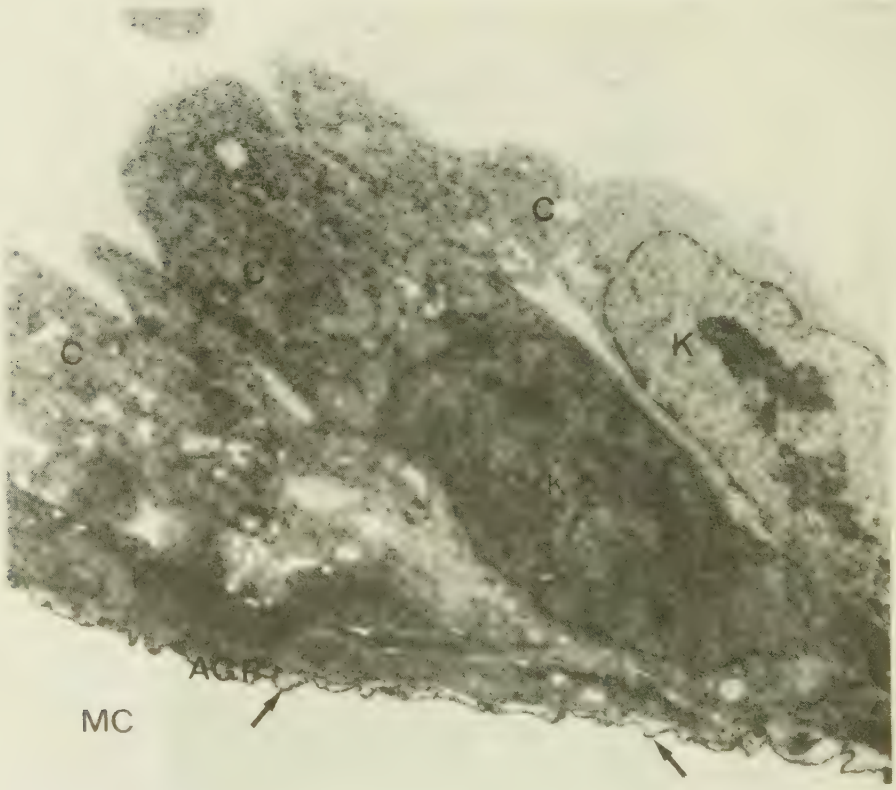
K = Kern
C = Cytoplasma
MC = Mikrocarrier
AGP= Anhaftungsglykoprotein
Vergrößerung: 12 000-fach

Abbildung 7: Ultradünnschnitt durch zwei 216 Stunden alte sekundäre FHE-Zellen. 48 Stunden p. inf. mit HP_1 440. FHE als "Dilayer" auf einem Mikrocarrier gewachsen.



K = Kern
C = Cytoplasma
MC = Mikrocarrier
AGP= Anhaftungsglykoprotein
Vergrößerung: 24 000-fach

Abbildung 8: Ultradünnschnitt durch drei übereinandergewachsene 144 Stunden alte sekundäre FHE-Zellen, als "Trilayer" auf einem Mikrocarrier gewachsen.

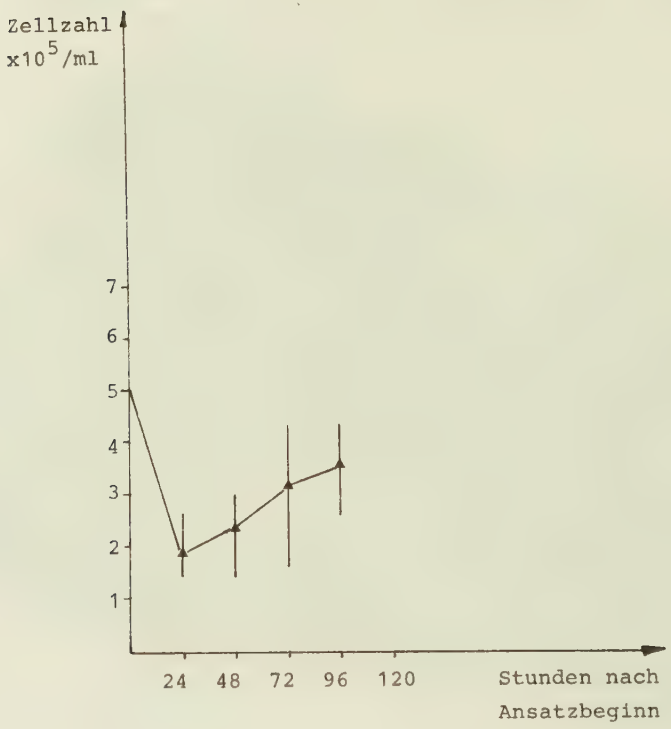


K = Kern
C = Cytoplasma
MC = Mikrocarrier
AGP= Anhaftungsglykoprotein
Vergrößerung: 12 000-fach

Tabelle 4: Übersicht über das Wachstumsverhalten bei der Züchtung von sekundären FHE-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Zeit in Stunden	Durchschnitts-wert $x10^5$/ml	minimaler Wert $x10^5$/ml	maximaler Wert $x10^5$/ml
0	5,0	5,0	5,0
24	1,9	1,4	2,6
48	2,4	1,4	3,0
72	3,0	1,6	4,3
96	3,6	2,4	4,3

Abbildung 9: Vermehrungskurve von sekundären FHE-Zellen auf Mikrocarrier bis zur maximalen Dichte der Zellen auf den bewachsenen Trägerpartikeln



3.2.1.3. Untersuchungen über die Züchtung von sekundären BEL-Kulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren

Um homogene Zellkulturen für diese Zellart bei der Züchtung im Mikrocarrier-Verfahren zu erhalten, wurden in stationären Kulturen dichtgewachsene primäre BEL-Zellen verwendet.

Hinsichtlich der Ansprüche an die Nährlösungen, Einsaatmenge und die Handhabung allgemein, erwies sich diese Zellart als relativ unkomplizierter im Vergleich zur Züchtung der FHE-Kulturen. Es konnte auch bei dieser Zellart ein physiologisches Absterben der Zellen und die Tendenz zur Verklumpung vor der Anlagerung auf den Trägerpartikeln festgestellt werden. Eine Reduzierung der Zellklumpenbildung und gleichzeitig eine bessere Verteilung der Zellen bewirkte die Zugabe von DMSO zum Anzuchtmedium. Somit war der erste Mediumwechsel auf 24 Stunden nach Ansatzbeginn festgelegt.

Das verwendete Anzuchtmedium bestand aus Earle MEM mit 5% FKS, 1% $NaHCO_3$, 0,5% DMSO und der üblichen Antibiotikazugabe.

Es galt bei dieser Zellart ein besonderes Augenmerk auf den pH-Wert, der öfter auf 6,6 während eines Kulturverlaufs absank, zu richten. Die pH-Regulierung erfolgte mittels eines Mediumwechsels. Die Inkubationszeit betrug 4 Stunden. Im Gegensatz zu den FHE-Kulturen war eine Einsaatdichte von $3x10^5$ Zellen/ml Medium bei den BEL-Zellen ausreichend.

Sämtliche Kulturansätze wurden im Brutraum bei +37°C durchgeführt. Die Mikrocarrier-Vorbehandlung und deren Konzentration für die Zellversuche entsprach der den FHE-Zellen. Die Anfangsdrehzahl des Magnetrührers betrug 40 UpM und wurde individuell bis auf maximal 80 UpM erhöht.

Neben den täglichen qualitativen und quantitativen Kontrollen erfolgte in einem Fall 48 Stunden nach Ansatzbeginn eine elektronenmikroskopische Kontrolle in Form einer REM-Untersuchung. Das Ergebnis wurde fotografisch festgehalten und ist in Abbildung 10 und 11 dargestellt.

Der Zellverlust bei den sekundären BEL-Kulturen ist während der ersten 24 Stunden der Kulturdauer mit dem der sekundären FHE-Zellen vergleichbar. Wie jedoch aus den Tabellen 4 und 5 und den Abbildungen 9 und 12 hervorgeht, ist die sich anschließende Vermehrungsrate bei den sekundären BEL-Zellen wesentlich besser, als die der sekundären FHE-Zellen.

In Zahlen ausgedrückt konnte bei den sekundären BEL-Zellen während einer Kulturdauer von 96 Stunden und einer Einsaatmenge von $3x10^5$ Zellen/ml Medium eine maximale Zellausbeute von $5,3x10^5$ Zellen/ml Medium erreicht werden, während bei den sekundären FHE-Kulturen bei gleicher Kulturdauer und einer Einsaatmenge von $5x10^5$ Zellen/ml Medium die maximale Vermehrungsrate nur $4,3x10^5$ Zellen/ml Medium erreichte. Somit konnten die sekundären BEL-Zellen fast verdoppelt werden, die Ausbeute bei den sekundären FHE-Zellen lag hingegen knapp unter der Einsaatmenge.

Abbildung 10: 48 Stunden alte sekundäre BEL-Zellen auf Cytodex^{TM}-1, 500-fach vergrößert (REM-Aufnahme)

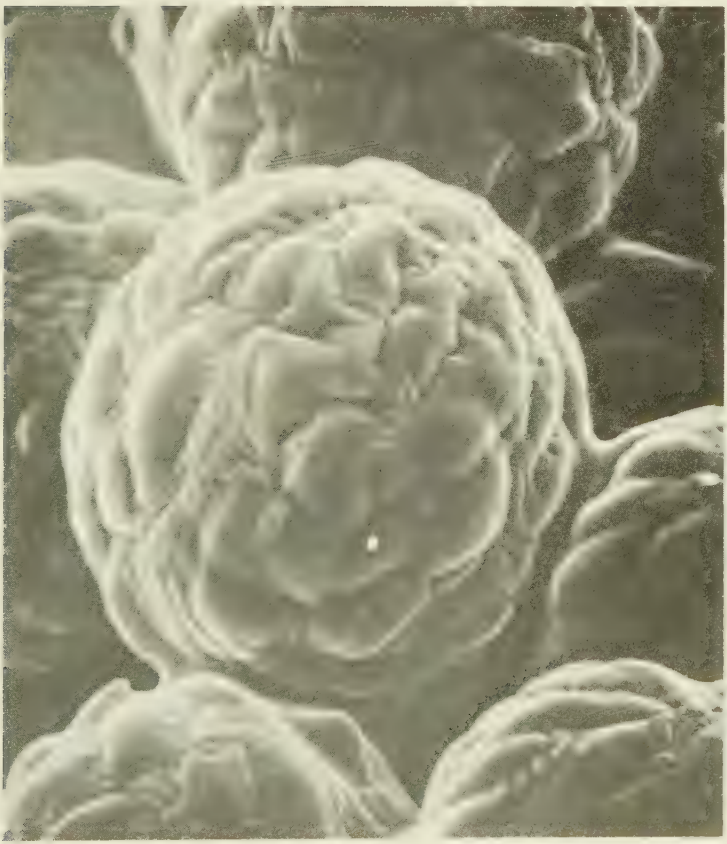


Abbildung 11: 48 Stunden alte sekundäre BEL-Zellen auf Cytodex^{TM}-1, 160-fach vergrößert (REM-Aufnahme)

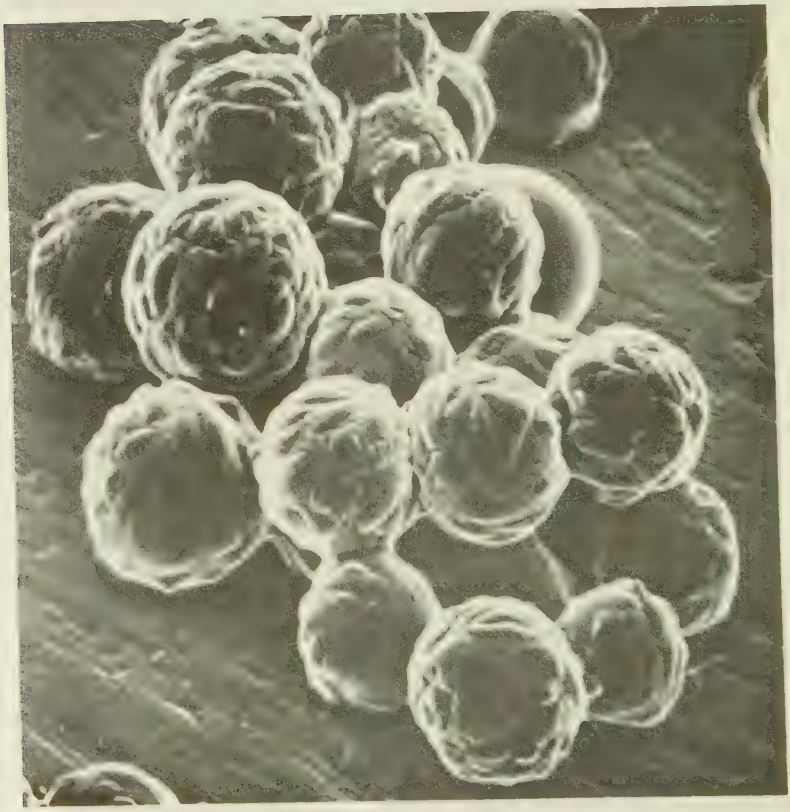
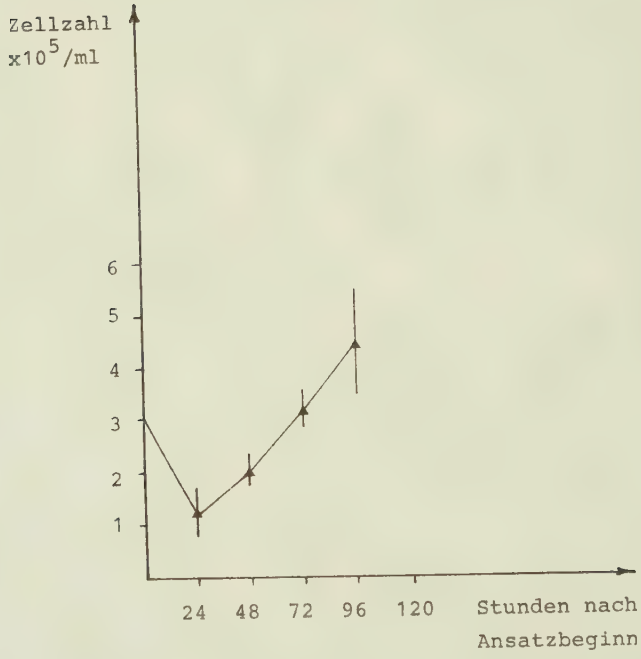


Tabelle 5: Übersicht über das Wachstumsverhalten bei der Züchtung von sekundären BEL-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Zeit in Stunden	Durchschnittswert $x10^5$/ml	minimaler Wert $x10^5$/ml	maximaler Wert $x10^5$/ml
0	3,0	3,0	3,0
24	1,2	0,8	1,7
48	2,0	1,8	2,3
72	3,2	2,8	3,4
96	4,4	3,5	5,3

Abbildung 12: Vermehrungskurve von sekundären BEL-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren bis zum Dichtwachsen der Zellen auf den bewachsenen Trägerpartikeln



3.2.1.4. Untersuchungen über die Züchtung von Vero-Zellkulturen mit dem Mikrocarrier-Verfahren

Diese permanente Affennierenzell-Linie ist bei der stationären Zellzüchtung unproblematisch zu handhaben. Die Zellen werden in regelmäßigen Abständen meist im Verhältnis 1 : 2 vermehrt.

Für die Zellkulturversuche der Vero-Zell-Linie mit der Mikrocarrier-Technik wurden in stationären Kulturen dichtgewachsene Zellen der entsprechenden Passage verwendet. Die Ablösung des Zellrasen erfolgte mit einer Trypsin-Versen-Lösung (STV-Lösung). Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation von der Enzymlösung getrennt. Nach Bestimmung der Zelldichte von $5x10^5$ Zellen/ml Medium für den Ansatz der Kulturen resuspendierten wir die Zellen in Anzuchtmedium, bestehend aus Earle MEM mit 5% FKS, 1% $NaHCO_3$ und der gewohnten Antibiotikazugabe. Bei dieser Zellart konnte auf die Zugabe von DMSO zum Anzuchtmedium verzichtet werden, da wir nur sehr wenig Zellverklumpungen beobachteten, bzw. diese durch kräftiges durchsuspendieren der Zellsuspension beseitigt werden konnten. Jedoch kamen nur maximal 46% der Zellen zur Anhaftung auf den Carriern und zu einer erneuten Zellvermehrung. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich in einer physiologischen Absterberate der Zellen während der Anhaftungsphase auf den Trägerpartikeln zu suchen. Das Absinken der Zelldichte in den ersten 24 Stunden der Kulturansätze ist in Tabelle 6 und Abbildung 13 dargestellt. Die Vorbehandlung der Mikrocarrier erfolgte in der gewohnten Weise. Die Konzentration der Trägerpartikel betrug 2 g Trockensubstanz/l Medium.

Der rasch abfallende pH-Wert bis gelegentlich auf 6,6 wurde durch eine tägliche Substitution des Nährmediums gepuffert: dabei genügte es, die Hälfte des Mediums durch neues Anzuchtmedium in oben angegebener Zusammensetzung auszutauschen.

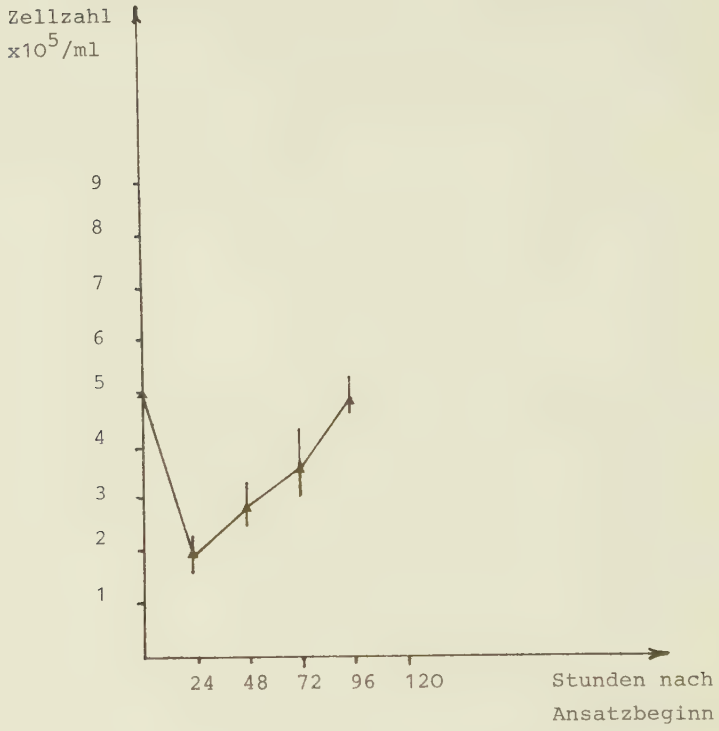
Während der ersten 24 Stunden der Kulturdauer sank bei den Versuchen mit Vero-Zellen im Mikrocarrier-System die Zellzahl auf Werte bis $1,7 \times 10^5$ Zellen/ml Medium ab.

Aus Tabelle 6 und Abbildung 13 ist jedoch zu entnehmen, daß die Zellausbeute während einer Kulturdauer von 96 Stunden wieder bis auf durchschnittlich 5×10^5 Zellen/ml Medium gesteigert werden konnte, somit also der Menge der ausgesäten Zellen (5×10^5 Zellen/ml Medium) gleichkam. Gelegentlich lag die Zellausbeute auch geringgradig über der Ausgangsmenge (siehe Tabelle 6 und Abbildung 13).

Tabelle 6: Übersicht über das Wachstumsverhalten bei der Züchtung von Vero-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Zeit in Stunden	Durchschnittswert $x10^5$/ml	minimaler Wert $x10^5$/ml	maximaler Wert $x10^5$/ml
0	5,0	5,0	5,0
24	2,0	1,7	2,3
48	2,9	2,6	3,3
72	3,7	3,2	4,3
96	5,0	4,7	5,3

Abbildung 13: Vermehrungskurve von Vero-Zellen im Mikrocarrier-Verfahren bis zum Dichtwachsen der Zellen auf den bewachsenen Trägerpartikeln



3.2.2. Vermehrung von Viren in Mikrocarrier-Zellkulturen im Vergleich zu stationären Zellkulturen

3.2.2.1. Vermehrung von Hühnerpockenvirus

Für die Versuche zur Vermehrung von Hühnerpockenvirus benützten wir sekundäre FHE-Zellen, die im Mikrocarrier-Verfahren (Volumen 250 ml Medium) während einer Kulturdauer von 96 Stunden einen nahezu dichten Zellrasen auf den Trägerpartikeln bildeten. Die sekundären FHE-Zellkulturen unterscheiden sich gegenüber den Primärkulturen durch eine homogenere Verteilung der Zellen und ein morphologisch einheitlicheres Aussehen. Zur Beimpfung der Zellkulturen diente das Hühnerpockenvirus Stamm HP-1 der 440. Passage in Primärkulturen aus embryonalen Hühnerfibroblasten (FHE). Der Virustiter betrug $10^{7,5}KID_{50}$/ml.

Die Beimpfung der Zellkulturen ging nach folgendem Modus vonstatten: Das Kulturgefäß wurde vom Magnetrührer genommen und 5 Minuten stehen gelassen, damit die Trägerpartikel sedimentieren konnten. Das überstehende Medium wurde bis auf wenige ml abgesaugt und durch virushaltiges Erhaltungsmedium, bestehend aus RAF mit 1,5% Phenolrot und der gewohnten Antibiotikazugabe bis auf das Ausgangsvolumen ersetzt. Dabei enthielt 1 ml Erhaltungsmedium $6,0x10^{5,5}$ KID_{50} Virus. Nach einer kurzen Inkubationszeit von 10 Minuten wurde das Kulturgefäß wieder auf den Magnetrührer gestellt und bei gleicher Drehzahl weitergerührt.

Die Virusvermehrung wurde täglich qualitativ anhand des fortschreitenden cythopathischen Effektes der an den Carriern anhaftenden Zellen kontrolliert. Am 4. Tag p. inf. war der cpE bei ca. 90% der Zellen voll ausgebildet. Nach allen bisherigen Erfahrungen ist dieser Zeitpunkt für eine Virusernte optimal. Die Ernte, bestehend aus virushaltigem

Medium, Carriern und Zelldetritus, wurde nach einem Gefriertauen bei -20°C pulsierend 15 Minuten lang beschallt (250 - 300 Watt). Nach Sedimentation der Mikrocarrier wurde die Suspension aus Zellfragmenten und Virusmaterial vorsichtig mit einer Pipette abgehebert, der Zelldetritus abzentrifugiert (2100 UpM, 4°C) und der Überstand bis zur Titerbestimmung bei -70°C gelagert.

Die Virustitration (in 10er-Potenzen) aus 6 verwendbaren Versuchen wurde in Primärkulturen aus FHE-Zellen, die in Zellkulturröhrchen gezüchtet wurden, durchgeführt. Die Berechnung des Titers nach der Methode von KÄRBER (1931) und SPEARMAN (1931) ergab einen durchschnittlichen Wert von $10^{8,0}$ KID_{50}/ml. Eine größere Anzahl von Versuchen konnte nicht zur Auswertung herangezogen werden, da technische Schwierigkeiten während der Kulturdauer auftraten und zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte.

In gleicher Anzahl von stationär gezüchteten Kulturen, die bezüglich Mediumvolumen/Zellzahl quantitativ mit den Mikrocarrier-Kulturen vergleichbar und mit derselben Virusmenge angeimpft wurden, konnte ein Virustiter von durchschnittlich $10^{7,5}$ KID_{50}/ml erzielt werden.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß die Virusvermehrung in den den Carriern anhaftenden Zellen gleich gut wie in stationären Zellkulturen abläuft, war interessant zu untersuchen, ob auch ein der Virusvermehrung parallel verlaufender cytopathischer Effekt in den Carrierzellen auftritt, bzw. ob er im Vergleich zu den stationären Zellkulturen verändert ist. Die Untersuchungen beweisen, daß in den Mikrocarrier-Kulturen ein deutlich ausgeprägter cpE auftritt. Er beginnt nach 48 Stunden p. inf., wird sehr deutlich sichtbar nach 72 Stunden und ist am stärksten ausgeprägt nach 96 Stunden (vergleiche vorher).

Bezüglich der Qualität der Veränderungen unterschied sich der cpE in den Mikrocarrier-Kulturen nicht von dem, wie er in stationären Zellkulturen abläuft. Die ersten sichtbaren Zellveränderungen bestehen in einer stärkeren Kontrastierung der Zellgrenzen. Dieser Effekt trat bei der gegebenen Animpfmenge nach 48 Stunden auf. Relativ rasch kommt es dann zur Abkugelung der Zellen, die dann schnell lysierten. Der cpE beginnt nicht gleichzeitig auf allen Mikrocarrier, erfaßte dann aber doch bis zum 4. Tag p. inf. praktisch alle Carrier.

In der Abbildung 14 ist ein typisches Bild des cpE in Mikrocarrier-Kulturen nach 72 Stunden und Abbildung 15 nach 96 Stunden wiedergegeben. Nach 72 Stunden ist der cpE gut auf einzelnen Carriern sichtbar (Pfeile), während andere Carrier noch voll bewachsen sind. Nach 96 Stunden hat der cpF auf alle Mikrocarrier-Kulturen übergegriffen. Ein Teil ist bereits total lysiert, während man auf anderen Carrier noch die abgekugelten Zellen deutlich ausmachen kann (Pfeile).

Abbildung 14: cytopathischer Effekt in Mikrocarrier-Kulturen aus FHE-Zellen beimpft mit Hühnerpocken-Virus 72 Stunden p. inf.

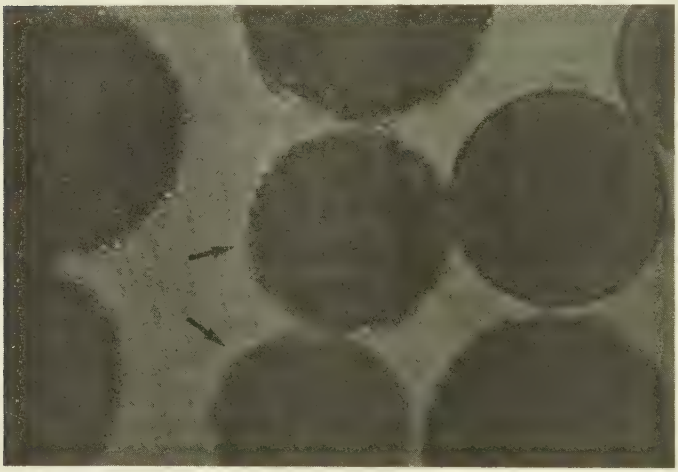
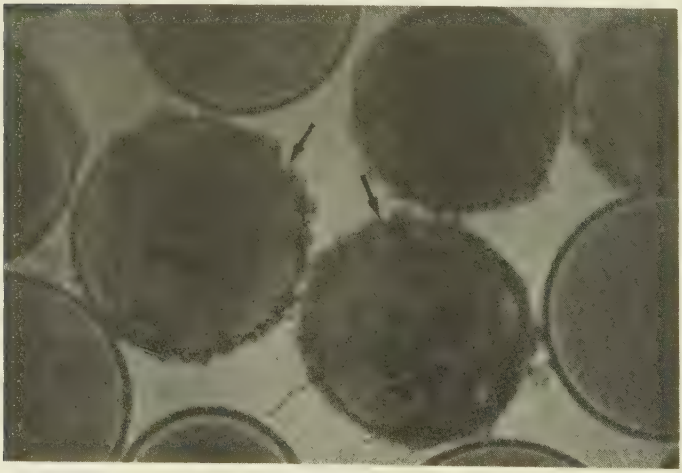


Abbildung 15: cytopathischer Effekt in Mikrocarrier-Kulturen aus FHE-Zellen beimpft mit Hühnerpocken-Virus 96 Stunden p. inf.



3.2.2.2. Vermehrung von Orf-Virus

Zur Vermehrung des Orf-Virus dienten sekundäre BEL-Kulturen, die im Mikrocarrier-Verfahren während einer Kulturdauer von 96 Stunden und einer Anzuchtmenge von 250 ml zu einem dichten Zellrasen gewachsen sind.

Die Mikrocarrier-Zellkulturen wurden mit dem Orf-Virus D-1701 der 3. Passage in BEL-Sekundärkulturen aus embryonalen Rinderlungen beimpft. Bei der Virusstammsuspension handelt es sich um plaquegereinigtes Material der 135. embryonalen Schafnierenpassage. Der Virustiter betrug $10^{7,5}$ KID/ml.

Die Beimpfung der Zellkulturen ging nach dem gleichen Modus wie bei den FHE-Kulturen vonstatten.

Das verwendete Virusmedium bestand aus Earle MEM mit 2% FKS, 1% $NaHCO_3$ und der Antibiotikazugabe in gewohnter Dosierung. Dabei enthielt 1 ml Erhaltungsmedium $1x10^{6,5}$ KID_{50}/ml Virus.

Der fortschreitende cpE im Zellrasen auf den Mikrocarrier wurde als Beurteilungskriterium für die Virusvermehrung herangezogen und täglich quantitativ kontrolliert.

Am 2. Tag p. inf. war der cpE an 90% der Zellen voll ausgebildet. Somit konnte das Virusmaterial geerntet werden. Die Ernte, bestehend aus virushaltigem Medium, Carrier und Zelldetritus wurde nach einem Gefriertauen (-20°C) 3 Minuten bei 300 Watt kontinuierlich mit Ultraschall behandelt. Die Trennung des Virusmaterial von den Trägerpartikeln und den Zellfragmenten erfolgte durch Abhebern mit anschließender Zentrifugation (2100 UpM, 4°C). Der Überstand wurde bis zur Auswertung bei -70°C gelagert. Die Auswertung der Versuche erfolgte (4 verwendbare Versuche) mittels Virustitration (in 10er-Potenzen) in Sekundärkulturen aus BEL-Zellen, die in Zellkulturröhrchen angelegt wurden.

Die Berechnung des Titers (Methode nach KÄRBER (1931) und SPEARMAN (1931)) ergab einen durchschnittlichen Wert von $10^{7,75}$ KID_{50}/ml.
Eine größere Zahl von Versuchen war durch technische Komplikationen für eine Auswertung nicht brauchbar.

In gleicher Anzahl von stationär gezüchteten Kulturen, die bezüglich Mediumvolumen/Zellzahl quantitativ mit den Mikrocarrier-Kulturen vergleichbar und mit derselben Virusmenge angeimpft wurden, konnt ein Virustiter von durchschnittlich $10^{7,75}$ KID_{50}/ml erzielt werden.

Die Ausbildung eines cpE in den Mikrocarrier-Kulturzellen unterschied sich nicht von der in stationären Kulturen. Der cpE war charakterisiert durch Zelldegenerationen, Zellverschmelzungen und Abkugelungen der Zellen, die letztlich lysierten. Zeitlich verlief der cpE bei der Vermehrung des Orf-Virus in den BEL-Kulturen wesentlich schneller als er bei der Vermehrung von Hühnerpockenvirus auftritt. Bei der gegebenen Animpfmenge waren bereits 48 Stunden p. inf. 90% der Zellen lysiert.

Zeitlich verlief der cpE in folgenden Phasen:

1. stärkere Kontrastierung der Zellgrenzen,
2. Zellverschmelzung mit Riesenzellbildung,
3. Abkugelung der Zellen,
4. Lysis.

3.2.2.3. Vermehrung von Reo-Virus

Für die Vermehrung des Reo-Virus (Typ 1, Stamm Lang, 4. Kulturpassage) wurden Vero-Zellen benutzt. Zum Zeitpunkt der Virusinfektion waren die auf den Mikrocarrier vermehrten Vero-Zellen 96 Stunden alt (dichtgewachsene Vero-Zellkulturen, Mediumvolumen 250 ml).

Die Beimpfung der Mikrocarrier-Zellkulturen erfolgte nach dem üblichen Modus. Das Erhaltungsmedium setzte sich aus Earle MEM, 2% FKS, 1% $NaHCO_3$ und der Antibiotikamenge in gewohnter Dosierung zusammen und enthielt pro ml $8{,}75 \times 10^{5{,}25}$ KID_{50} Virus.

Der fortschreitende cpE an den Zellen diente als Beurteilungskriterium für die Virusvermehrung. Am 2. Tag p. inf. war bei 90% der Zellen ein cpE voll ausgebildet, was für die Virusernte als optimal gilt.

Die Ernte setzte sich aus virushaltigem Medium, Trägerpartikeln und Zellfragmenten zusammen. Die Trennung der Ernte in die einzelnen Komponenten (vergleiche vorher) wurde nach einem Gefriertauen (-70°C) durchgeführt. Bis zur Auswertung des Virusmaterials wurde dieses bei -70°C gelagert.

Die Titration der Virusernten von 2 verwendbaren Versuchen wurde in Vero-Zellen, die in Zellkulturröhrchen angelegt wurden, durchgeführt und ergab nach dem üblichen Berechnungsschema einen Durchschnittswert von $10^{7{,}0}$ KID_{50}/ml. In den entsprechenden stationären Kontrollen, die bezüglich Mediumvolumen/Zellzahl quantitativ mit den Mikrocarrier-Kulturen vergleichbar und mit derselben Virusmenge angeimpft wurden, konnte ein Virustiter von durchschnittlich $10^{6{,}5}$ KID_{50}/ml erzielt werden.

Nach den Ergebnissen sind auf Mikroträger gezüchtete Vero-Zellen in gleichem Maß zur Virusvermehrung in der Lage wie Zellen stationärer Kulturen. Interessant war festzustellen, daß der cpE in gleicher Weise wie in den stationär gezüchteten Vero-Zellen abläuft. Zeitlich ließen sich folgende Phasen unterscheiden:

1. stärkere Kontrastierung der Zellgrenzen,
2. Abkugelung der Zellen (relativ kurz),
3. Lysis (vollständig).

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Die Zellzüchtung im Mikrocarrier-Verfahren ist eine noch recht junge Technik zur Herstellung von Massenzellkulturen aus verankerungsabhängigen Zellen. Die Optimierung der Züchtung von verankerungsabhängigen Zellen hat stets Anlaß zur Entwicklung von neuen Techniken und Systemen gegeben. Die sich derzeit noch in der Erprobung befindliche Mikrocarrier-Technik auf der Basis von DEAE-Sephadex A 50 (VAN WEZEL, 1967) stellt deshalb auch sicher nicht die Endphase dieses Prozesses dar.

Die Anwendung des Mikrocarrier-Verfahrens ist für eine Reihe von Primärzellen, diploiden Zell-Linien sowie permanenten Zell-Linien tierischen und menschlichen Ursprungs mit recht unterschiedlichem Erfolg beschrieben worden (HIRTENSTEIN et al., 1979).

Wir haben uns in dieser Arbeit die Aufgabe gestellt, embryonale Hühnerfibroblasten (FHE), embryonale Rinderlungenzellen (BEL) und als Beispiel für eine permanente Zell-Linien Affennierenzellen (Vero) auf Mikroträgern auf Dextranbasis (Cytodex^{TM}-1, Fa. Pharmacia) zu züchten, um diese Methode mit gleichen Zellen im stationären System zu vergleichen.

FHE- und BEL-Zellen gewinnen in der Tiermedizin immer mehr an Bedeutung zur Herstellung von Impfstoffen und Paramunitätsinducern. Über ihre Züchtung im Mikrocarrier-System ist im Vergleich zu den Vero-Kulturen von den FHE-Zellen nur wenig, von den BEL-Zellen bislang nichts bekannt. Wie sich in einer Reihe von orientierenden Kulturansätzen herausgestellt hat, sind diese beiden Zellarten auf Mikroträgern zwar durchaus züchtbar, die Ergebnisse aber nicht identisch reproduzierbar. Dies wäre aber Voraussetzung für einen routinemäßigen Einsatz. Unsere Untersuchungen

befassten sich deshalb überwiegend damit, für diese Zellen Methoden auszuarbeiten, Fehlerquellen zu eruieren und Parameter festzulegen, die eine routinemäßige Verwendung des Mikrocarrier-Verfahrens für die Züchtung von FHE- und BEL-Zellen ermöglichen.

Die Vermehrung von Vero-Zellen als Vertreter permanenter Zell-Linien erwies sich in unseren Versuchen ebenso unproblematisch wie in der Literatur von anderen Autoren beschrieben ist.

Die FHE-Zellen, insbesondere die Sekundärzellen müssen mit einer Mindestmenge von $5x10^5$ Zellen/ml Medium eingesät werden, um in einer angemessenen Zeit (96 Stunden) einen konfluenten Zellrasen bilden zu können. Wir haben festgestellt, daß sich mindestens 5 - 10 Zellen/Mikroträger anhaften müssen, um eine anschließende Vermehrung zu gewährleisten.

Bei den BEL-Zellen genügt die Einsaatmenge von $3x10^5$ Zellen/ml Medium, um in gleicher Zeit dichtzuwachsen.

Die Zelleinsaatmenge ist bei beiden Zellarten relativ hoch, was für die Kultivierung in dieser Art ein Mehr an Ausgangsmaterial (fetale Organe) bedeutet. Der Grund für diese hohe Zellzahlen als Startbedingung liegt darin, daß es kurz nach der Einsaat zu Zell-Verklumpungen kommt, die zusätzlich zur physiologischen Absterberate eine starke Reduktion der zur Anhaftung fähigen Zellen bedingen. Durch geeignete Techniken ließ sich dieser Verlust zwar vermindern, aber nicht ganz beheben. Das Problem der Zell-Verklumpung konnte durch den Zusatz von DMSO ins Anzuchtmedium (0,5%) weitgehend beseitigt werden. Dadurch kam es zu einer besseren Verteilung der Zellen im Medium, demzufolge auch zu einer gleichmäßigeren Anlagerung und Haftung auf den Carriern. Der Zellverlust

lag jedoch noch immer bei 40 - 50%. in den weiteren Versuchen stellte sich heraus, daß das DMSO zu einer Wachstumshemmung führt, und deshalb die Teilungsrate nach der Anhaftung weitgehend ausblieb. Dieser unerwünschte Einfluß von DMSO ließ sich durch einen Mediumwechsel 24 Stunden nach Ansatzbeginn beseitigen. Das DMSO wurde somit entfernt und seine wachstumsinhibierende Eigenschaft ausgeschaltet, ohne auf seinen Nutzeffekt (Erhöhung der Suspensionsbereitschaft der Zellen zu Beginn des Ansatzes) verzichten zu müssen.

Bei den FHE-Zellen erwiesen sich die Primärzellen als wachstumsintensiver als die Sekundärzellen. Der Vorteil letzterer war aber ihr homogenes Wachstum und ihre morphologische Einheitlichkeit. So konnten während einer Kulturdauer von 96 Stunden bei den primären FHE-Zellen an den Carriern angewachsene Zellen bis zu 13×10^5 Zellen/ml Medium gezählt, bei den sekundären FHE-Zellen ein Ergebnis von nur $4{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml Medium erzielt werden. Als weiterer Vorteil der sekundären FHE-Zellen stellte sich die längere Persistenz bis zu 8 Tage nach Dicht werden der Zellen an den Carriern heraus. Dies ist Vorbedingung für die Züchtung von langsam sich vermehrenden Viren, z.B. von Hühnerpockenvirus.

Die Ausbeute der BEL-Zellen betrug maximal $5{,}3 \times 10^5$ Zellen/ml Medium. Bei dieser Zellart war die Regulierung des pH-Wert besonders wichtig. Die Stabilisierung konnte durch einen Mediumwechsel erreicht werden. Hinsichtlich Mediumwechsel und Drehzahlsteigerung mußte jedoch der Individualität jedes einzelnen Mikrocarrier-Kulturansatzes Rechnung getragen werden. Grundsätzlich sollte zu Beginn des Kulturansatzes die Drehzahl von 30 UpM nicht unterschritten werden, weil die Gefahr der Sedimentation der Trägerpartikel gegeben ist. Drehzahlen über 60 UpM innerhalb der ersten 24 Stunden bewirken eine Ablösung der Zellen bzw. beeinflussen die Phase der Anhaftung ungünstig.

Nach dem Festsetzen der Zellen bzw. Zellkonglomeraten empfiehlt sich die Erhöhung der Drehzahl im Verhältnis zur Bewachsungsdichte. Bei vollständig bewachsenen Mikrocarriern steigerten wir die Drehzahl bis auf 80 UpM, die einerseits für die Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ausreichend war, andererseits aber auch keine mechanische Schädigung der Zellen bewirkte . Weiterhin zeigte sich in den Vorversuchen mit diesen Zellarten (FHE, BEL), daß bei fortschreitender Kultivierung der Ersatz von Anzuchtmedium durch Erhaltungsmedium nicht wie bei Stationärkulturen ohne Zusatz fetalen Serums erfolgen kann. Vor allem primäre und sekundäre FHE-Kulturen erreichten durch einen geringen Anteil fetalen Serums einen Wachstumsschub, der sich nach Zugabe eines homologen Serums (1 - 2% Hühnerserum bei FHE-Zellen, 5 - 10% fetalen Kälberserum bei BEL-Zellen) noch deutlicher zeigte. Anscheinend sind Serumfaktoren nicht nur für das Wachstum notwendig, sondern gewährleisten durch ihre Anwesenheit eine vermehrte Synthese von Fibronektin , unterstützen somit die Anhaftung der Zellen am Mikroträger und sorgen ernährungsphysiologisch für den Stoffwechsel der Zellen nach deren Anlagerung. Je nährstoffreicher das Erhaltungsmedium bei diesem System ist, um so mehr ist die Lebensfähigkeit eines konfluenten Zellrasen gegeben, womit gleichzeitig die Voraussetzung für die Vermehrung von Virus notwendige Persistenz der Zellen geschaffen ist.

Bei den BEL- und bei den FHE-Zellen gaben elektronenmikroskopische Untersuchungen in Form von REM- und TEM-Kontrollen Aufschluß über Anhaftung und Wachstumsverhalten auf den Carriern (Abbildung 4, 5, 10 und 11). Dabei kam es bei den sekundären FHE-Zellen zur Ausbildung von Mono-, Di- und Trilayern (Abbildung 6, 7 und 8). Interessant war, daß auch die Ultradünnschnittechnik für die bewachsenen Carrier durchaus anwendbar ist. Mit ihrer Hilfe ließ sich nachweisen, daß die FHE-Zellen nicht

unmittelbar den Carriern bei ihrer Vermehrung anhaften. Zwischen Zelle und Carrier bildet sich eine Schicht Fibronektin aus. Sie ist neben Ladungskräften maßgeblich an der Anhaftung der Zellen an den Carriern beteiligt (siehe Abbildung 2). Dieses Fibronektin , das auch als Anhaftungsglykoprotein (AGP) bezeichnet wird, ist ein Serumfaktor wird aber auch zu einem gewissen Anteil von den Zellen selbst synthetisiert (HIRTENSTEIN et al., 1979). In Abbildung 8 (Pfeile) zeichnet sich die Fibronektin- oder Anhaftungsglykoproteinschicht (AGP-Schicht) recht deutlich zwischen Carrier (MC) und Zelle als dunkle Zone ab. In Abbildung 6 und 7 ist sie ebenfalls zu sehen, jedoch nicht so ausgeprägt.

Versuche zur Virusvermehrung waren notwendig, um nachzuweisen, daß auch an den Mikrocarriern anhaftende Zellen für die Vermehrung von Viren imstande sind. Dabei sollte überprüft werden, ob die relativ schwer im Mikrocarrier-System kultivierbaren FHE-Zellen auch noch für die Vermehrung von Hühnerpockenvirus stoffwechselaktiv genug sind. Wir konnten zunächst nachweisen, daß in den auf Carrier gezüchteten Zellen eine zufriedenstellende Virusvermehrung abläuft, die bei lichtmikroskopischer Kontrolle dem Infektionsverlauf bei stationären Kulturen gleicht; der cytopathische Effekt unterschied sich in keiner Weise.

Die quantitative Aussage stellt die Zellausbeute in ein direktes Verhältnis zum Infektiositätstiter. Bei der Beimpfung eines konfluenten Zellrasens ergaben sich auch bessere Virusernten.

Dasselbe gilt auch für die Vermehrung von Orf-Virus in sekundären BEL-Zellen, die im Mikrocarrier-Verfahren gezüchtet wurden.

Für die Kontrolle der Anhaftung und Vermehrung der Zellen und des Verlaufs der Virusvermehrung (cpE) erwies sich die lichtmikroskopische Beurteilung nach Fixierung der Zellen auf dem Trägermaterial von einer Stichprope, die beliebig oft entnommen werden kann, als sehr gutes Beurteilungssystem. Durch die gute Transparenz des Materials können die Phasen einer virusproduzierenden und absterbenden Zelle sogar wesentlich besser qualifiziert werden als bei der Stationärkultur. Zudem sind diese Mikroträger durch ihre optisch erfaßbare Räumlichkeit besser geeignet, Vorgänge oder Veränderungen an oder auf der Zelle wahrzunehmen.

Gerade auf dem Gebiet der Bewegungsphysiologie einzelner Zellen oder eines Zellverbandes (z.B. Muskelzellen), deren verankerungsabhängiger Charakter wir allerdings voraussetzen müssen, könnte diese Art der Zellkultivierung und die eben erwähnten Kontrollmöglichkeiten in Form von Momentaufnahmen für die Erforschung der Zellmorphologie in vivo eine ausgezeichnete Basis bieten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Kultivierung von tierischen und menschlichen Zellen im Mikrocarrier-Verfahren ist eine neue Methode zur Zellzüchtung im Großen. Sie vereinigt in sich die Vorteile der verankerungsabbhängigen Methoden mit der herkömmlichen Suspensionstechnik. Für das Mikrocarrier-Verfahren eignen sich grundsätzlich alle Zellen. Während die Züchtung von permanenten Zell-Linien problemlos ist, müssen für die Kultivierung primärer und sekundärer Zellkulturen jeweils spezifische Techniken angewandt werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die für die Züchtung von primären und sekundären Hühnerembryofibroblastenkulturen (FHE) sowie von sekundären embryonalen Rinderlungenzellen (BEL) erforderlichen speziellen Techniken beschrieben. Die Anhaftung und Vermehrung der Zellen an den Carriern wurde elektronenmikroskopisch mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und anhand von Ultradünnschnitten beobachtet und bildmäßig dokumentiert. Daraus wird ersichtlich, daß sich zwischen Carrier und Zelle eine Schicht Fibronektin oder Anhaftungsglykoprotein (AGP) bildet, die neben Ladungskräften maßgeblich für die Anhaftung der Zellen an der porösen Oberflächenstruktur der Carrier verantwortlich ist. Der zeitliche und quantitative Verlauf der Anhaftung sowie die Vermehrung der Zellen ist auch mikroskopisch einfach nachweisbar, was die Kontrolle über den Verlauf der Anzüchtung wesentlich erleichtert.

Bei der Einsaat der für die Mikrocarrier-Technik bestimmten Anzuchtzellen kommt es innerhalb der ersten 24 Stunden zunächst zu einem starken Verlust von anhaftungsfähigen Zellen. Verantwortlich hierfür sind Zellverklumpungen und physiologisch bedingte Absterberaten.
Durch geeignete Techniken ließ sich dieser

Verlust verringern, aber nicht ganz beheben.

Für die Virusvermehrung in den Carrier-Zellkulturen ist die Persistenz der Zellen an den Carriern Vorbedingung. Die FHE-Kulturen lösten sich durch die Bildung von Polylayern relativ rasch ab. Durch geeignete Techniken gelang die Anhaftung dieser Zellen an den Carriern für 6 - 8 Tage. Hierdurch wurden die Voraussetzungen für die Vermehrung von Hühnerpockenviren geschaffen.

Die im Mikrocarrier-Verfahren kultivierten FHE- und BEL-Zellen erwiesen sich für die Vermehrung von Viren gleichermaßen geeignet wie konventionelle, stationäre Zellkulturen. Im einzelnen wird die Vermehrung von Hühnerpockenvirus in FHE- und von Orf-Virus in BEL-Kulturen nachgewiesen und qualitativ erfaßt. In beiden Mikrocarrier-Kultursystemen kam es parallel zur Intensität der Virusvermehrung zu cytopathischen Effekten, die sich nicht von denen in stationären Kulturen unterscheiden. Damit ist die Kontrolle der Virusvermehrung in Mikrocarrier-Zellkulturen lichtoptisch in ähnlicher Weise möglich wie in konventionellen Kultursystemen.

SUMMARY

The cultivation of animal and human cells by means of the microcarrier-system is a new method for the large-scale production of cells. The characteristic of this system is the connection of anchoragedependent methods with the suspension culture technique. In principle all kinds of cells can be used in the microcarrier-system. While the cultivation of established or transformed cell-lines on microbeads can be performed without any problem. There are special methods for both primary and secondary cell cultures for cultivation in the microcarrier-system necessary.

The special techniques required for cultivation of primary and secondary chicken embryonic fibroblast cells and secondary bovine embryonic lung cells are described in this paper. Adhesion and multiplication of these cells grown on microbeads was controlled by scanning- and transmission-electronic microscopy and documented by photography. Photography demonstrated that the attachment of cells on the microcarrier-surface is conditioned by both an amphoteric glycoprotein, called fibronectin or attachmentglycoprotein (AGP) and electrostatic forces.

Growth of the cell cultures was also followed by staining the cells and by microscopic control.

During the first 24 hours of culture there was an enormous cell loss. Cell-clumping and the physiological death of cells are the main reasons therefore. This loss of cells could be reduced by application of special techniques but not completely eliminated.

The main condition for virus production in microcarrier-cultures is the long persistence of the cells on the bead surface.

The chicken embryonic fibroblast cells soon detached by forming polylayers. The use of special methods during the cultivation of this kind of cells yielded an attachment for 6 to 8 days. This period is necessary for the propagation of fowlpox-virus.

The microcarrier-cultures of chicken embryonic fibroblast cells and bovine embryonic lung cells proved to be as useful for virus propagation as well as stationary cultures of the same cells. In detail the propagation of fowlpox-virus in chicken embryonic fibroblast cells grown on microbeads and of orf-virus grown on bovine embryonic lung cells in the same system was demonstrated.

There was no difference in the morphology of cytopathogenic effects between the stationary culture cells and microbead-culture-grown cells. It is therefore possible to control virus propagation in microbeads by microscope in the same way as for conventional culture systems.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. BEAUDRY, Y., J.P. QUILLON, J. FRAPPA and R. DELOINCE, 1979: Culture of diploid and heteroploid cells on dextran "microbeads" in suspension: studies of growth kinetics. Biotechnol. Bioeng. 21, 2351

2. BONIN, O., 1973: Quantitativ-virologische Methodik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

3. CLARK, J., M. HIRTENSTEIN and C. GEBB, 1979: Critical parameters in the microcarrier culture of animal cells. Presented at the third general meeting of the european society of animal cell technology, Oxford, England

4. EARLE, W.R., 1934: A technique for adjustment of oxygen and carbon dioxide tensions and hydrogen in concentration in tissue cultures planted in carrel flasks. Arch. exp. Zellforsch. 16, 116

5. EARLE, W.R., J.C. BRYANT and E.L. SCHILLING, 1954: Certain factors limiting the size of the tissue culture and the development of massive culture. Ann. N.Y. Acad. Sci. 58, 1000

6. EARLE, W.R., E.L. SCHILLING and J.C. BRYANT, 1954: Influence of tube rotation velocity on profiferation of strain L-cells in surface substrate roller-tube cultures. J. Nat. Cancer Inst. 14, 853

7. EARLE, W.R. and F. HIGHOUSE, 1954: Culture flasks for use with plane surface substrate tissue cultures. J. Nat. Cancer Inst. 14, 841

8. FONTANGES, R., P. DESCHAUX and Y. BEAUDRY 1971: Apparatus for continous, large-volume suspended cell cultivation. Biotechnol. Bioeng. 13, 457

9. GEY, G.O., 1933: An improves technique for massive tissue culture. Am. J. Cancer, 17, 752

10. GIARD, D.J., W.G. THILLY, D.I.C. WANG and D.W. LEVINE, 1977: Virus production with a newly developed microcarrier system. Appl. Microbiol. 34, 668

11. GRINNELL, F., D.G. HAYS and D. MINTER, 1977: Cell adhesion and spreading factor, partial purification and properties. Exp. Cell Res. 110, 175

12. GRINNELL, F., 1978: Celluar adhesiveness and extracellular substrata. Int. Rev. Cytol. 53, 65

13. GRINNELL, F. and M.K. FELD, 1979: Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium possible role of secreted fibronectin. Cell 17, 117

14. GRINNELL, F., 1980: Fibroblast receptor for cell-substratum adhesion: studies on the interaction of baby hamster kidney cells with latex beads coated by cold insoluble globulin (plasma fibronectin) The Journal of Cell Biology. 86, 104

15. HANKS, J.H., 1948: The longevity of chick tissue cultures without removal of medium. J. cell. comp. Physiol. 31, 235

16. HIRTENSTEIN, M., J. CLARK, G. LINDGREN and P. VRETBLAD, 1979: Microcarriers for animal cell culture: a brief review of theory and practice. Presented at the third general meeting of the european society of animal cell technology, Oxford, England

17. HORNG, C.B. and W. MCLIMANS, 1975: Primary suspension culture of calf anterior pituitary cells on a microcarrier surface. Biotechnol. Bioeng. 17, 713

18. HYNES, R.O. and A.T. DESTREE, 1978: Relationships between fibronectin (LETS-protein) and actin. Cell. 15, 875

19. KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480

20. KEAY, L. and S. SCHLESINGER, 1974: Production of sindbis, influenza and vesicular stomatitis viruses in chicken embryo and rat embryo cell suspensions. Biotechnol. Bioeng. 16, 1024

21. KNAZEK, R.A. and P.M. GULLINO, 1972: Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. Science 178, 65

22. LEVINE, D.W., J.S. WONG, D.I.C. WANG and W.G. THILLY, 1977: Microcarrier cell culture: new methods for research-scale application. Somatic Cell Genetics 3, 149

23. LEVINE, D.W., D.I.C. WANG and W.G. THILLY, 1979: Optimization of growth surface parameters in microcarrier cell culture. Biotechnol. Bioeng. 21, 821

24. LIEBICH, H.G., 1981: pers. Mitt.

25. MACKENZIE, C.G., J.B. MACKENZIE and P. BECK, 1961: The effect of pH on growth, protein synthesis and lipid rich particels of cultured mammalian cells. J. biophys. biochem. Cytol. 9, 141

26. MAROUDAS, N.G., 1973: New techniques for large scale culture of anchoragedependent cells. New Techniques in Biophysics and Cell Biology, 1

27. MAROUDAS, N.G., 1975: Adhesions and spreading of cells on charged surfaces. J. Theor. Biol. 49, 417

28. MAYR, A. und K. KALCHER, 1960: Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur. Arch. ges. Virusforschung 10, 72

29. MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK und G. WITTMANN, 1974: Virologische Arbeitsmethoden, Band I Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1974

30. MCLIMANS, W.F., E.V. DAVIS, F.L. GLOVER and G.W. RAKE, 1957: The submerged culture of mammalian cells: the spinner culture. J. Immunol. 79, 428

31. MEIGNIER, B., 1979: Cell culture on beads used for the industrial production of foot and mouth disease virus. Dev. Biol. Stand. 42, 141

32. MITCHELL, K.J. and W. WRAY, 1979: Miotic cell populations obtained from a micro-carrier culturing system. Exp. Cell Res. 123, 452

33. MOORE, G.E. and K. ULRICH, 1965: Suspension cultures of mammalian cells. J. surgical Res. 5, 270

34. NICHOLSON, B.L., 1980: Growth of fish cell lines on microcarriers. Appl. Microbiol. 39, 394

35. PRODUKTINFORMATION DER FA. BIO-RAD, 1978: Microspheres dramatically increase cell production, slash space requirements.

36. PRODUKTINFORMATION DER FA. PHARMACIA, 1978: Beaded microcarriers for cell culture.

37. PRODUKTINFORMATION DER FA. PHARMACIA, 1979: Mikrocarrier-Kulturen mit Cytodex^{TM}-1. Hinweise zum erfolgreichen Arbeiten mit Cytodex^{TM}-1.

38. PRODUKTINFORMATION DER FA. PHARMACIA, 1981: Microcarrier cell culture technical notes. Key points for success with Cytodex^{TM}-1.

39. RÖMPP, H., 1966: Chemie Lexikon, sechste Auflage, 1966 Frank´sche Verlagshandlung, Stuttgart

40. SPEARMAN, C., zitiert nach KÄRBER, G., 1931: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Path. Pharmak., 162, 480

41. SANFORD, K.K., W.R. EARLE, V.J. EVANS, H.K. WALTZ and J.E. SHANNON, 1951: The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. J. Nat. Cancer. Inst. 11, 773

42. SANTERO, G.G., 1972: The "rotary column" method for growth of large-scale quantities of cell monolayers. Biotechnol. Bioeng. Vol. 14, 754

43. SCHLECHT, S., K. RING, J. KUTSCHER und W. ESCHWEILER, 1968: Ein neuer Laboratoriumsfermenter zur Züchtung von Mikroorganismen im turbiostatischen und "bath"-Verfahren. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, 206, 246

44. SPIER, R.E. and J.P. WHITESIDE, 1976: The production of foot-and-mouth-disease virus from BHK 21 C 13 cells grown on the surface of DEAE-Sephadex A-50 beads. Biotechnol. Bioeng. 18, 659

45. SPIER, R.E., J.P. WHITESIDE and K. BOLT, 1977: Trypsinzation of BHK 21 monolayer cells grown in two large-scale unit process systems. Biotechnol. Bioeng. 19, 1735

46. SCHLEICHER, J.B. and R.E. WEISS, 1968: Application of a multiple surface culture propagator for the production of cell monolayers, virus and biochemicals. Biotechnol. Bioeng. 10, 617

47. TELLING, R.C. and C.J. STONE, 1964: A method of automatic pH-control of a bicarbonate-CO_2 buffer system for the submerged culture of hamster kidney cells. Biotechnol. Bioeng. 6, 147

48. TELLING, R.C. and R. ELSWORTH, 1965: Submerged culture of hamster kidney cells in a stainless steel vessel. Biotechnol. Bioeng, 7, 417

49. VAN HEMERT, P., 1964: The "Bilthoven Unit" for submerged cultivation of microorganisms. Biotechnol. Bioeng. 6, 381

50. VAN HEMERT, P., D.G. KILBURN and A.L. VAN WEZEL, 1969: Homogenous cultivation of animal cells for the production of virus and virus products. Biotechnol.Bioeng. 11, 875

51. VAN WEZEL, A.L., 1967: Growth of cell-strains and Primary cells on microcarriers in homogeneous culture. Nature, 216, 64

52. VAN WEZEL, A.L., 1972: New trends in the preparation of cell substrates for the production of virus vaccines. Progr. immunobiol. Standard., 5, 187

53. VAN WEZEL, A.L., 1973: Microcarrier cultures of animal cells. Tissue Culture, Methods and Applications, 372

54. VAN WEZEL, A.L., 1977: The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarriers. Develop. biol. Standard. 37, 143

55. VAN WEZEL, A.L. and G. VAN STEENIS, 1977: Production of an inactivted rabies vaccine in primary dog kidney cells. Presented at the symposium on standardisation of rabies vaccines for human use produces in tissue culture, Marburg, Germany

56. VAN WEZEL, A.L. and C.A.M. VAN DER VELDEN DE GROOT, 1978: Large scale cultivation of animal cells in microcarrier culture. Process. Biochem. March 1978, 6

57. VOGELAAR, J.P.M. and E. EHRLICHMANN, 1933: A feeding solution for cultures of human fibroblasts. Am. J. Cancer 18, 28

58. WEISS, R.E. and J.B. SCHLEICHER, 1968: A multisurface tissue propagator for the mass-scale growth of cell monolayers. Biotechnol. Bioeng. 10, 601

59. WHITESIDE, J.P., B.R. WHITING and R.E. SPIER, 1979: Development of a methodology for the production of foot and mouth disease virus from BHK C 13 monolayer cells grown in a 100 l (20 m^2) glass sphere propagator. Dev. Biol. Stand. 42, 113

60. YAMADA, K.M., 1978: Immunological charakterization of a major transformation-sensitive fibroblast cell surface glycoprotein. The Journal of Cell Biology 78, 520

61. YAMADA, K.M. and K. OLDEN, 1978: Fibronectins-adhesive glycoproteins of cellsurface and blood. Nature 275, 179

62. ZAPF, B., 1974: Kontaktinhibitionsverlauf bei Säugerzellen. Untersuchungen mit automatisierten Methoden. Med. Diss. Berlin

Herrn Prof. Dr. DDr. h.c. A. Mayr danke ich für die Überlassung des Themas und seine jederzeit gern gewährte Unterstützung.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. H.G. Liebich vom Institut für Histologie und Embryologie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen aussprechen.

Herrn Dr. R. Brunner und Fräulein I. Neubauer ein herzliches Dankeschön für ihre ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

LEBENSLAUF

Am 24. Dezember 1954 wurde ich, Karl-Heinz Bucher, als zweiter Sohn des Landwirts Paul Bucher und der Rosa Mayer, geborene Wiedergrün, verwitwete Bucher, in Riedlingen geboren.

Im April 1961 trat ich in die Grund- und Hauptschule in Riedlingen ein. 1965 wechselte ich in das Kreisgymnasium Riedlingen über. Dort legte ich am 7. Juni 1973 die Reifeprüfung ab.

Vom 1. Juli 1973 bis 30. September 1974 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Im November 1974 nahm ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig Maximilians-Universität München auf. Dort schloß ich im September 1979 mit dem 3. Teil des Staatsexsamens ab und erhielt im Oktober 1979 meine Aprobation als Tierarzt. Seit Oktober 1979 arbeite ich als Doktorand am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität München.